

TESIS DOCTORAL

Dirigida por el Prof. Dr. D. Eduardo L. Rodríguez-Echanda. Profesor Agregado del Departamento de Morfología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid.

Los botones gustativos: un modelo de diferencia
ción neurodependiente.

Por Margarita L. Rodrigo Angulo.

Reg F.C-8857



Madrid 1977

EDUARDO L. RODRIGUEZ-ECHANDIA, DOCTOR EN MEDICINA Y PROFESOR AGREGADO DEL DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD AUTONOMA DE MADRID.

CERTIFICO: Que Margarita L. Rodrigo Angulo ha realizado bajo mi dirección el trabajo de investigación que presenta como Tesis para optar al grado de Doctor "Los botones gustativos: un modelo de diferenciación neurodependiente", que ha terminado con el mayor aprovechamiento.

Revisado el presente trabajo quedo conforme con su presentación para ser juzgado.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos, firmo el presente en Madrid a 17 de Junio de 1977.



A handwritten signature in black ink, appearing to be "E. Rodriguez-Echandia". The signature is written in a cursive style with a large loop at the end.

Capítulo 1. INTRODUCCION.

No es posible conseguir un trabajo eficaz dentro de los límites de cualquier ciencia, sin la colaboración de un equipo coordinado. El presente trabajo ha sido realizado en un clima de cooperación y compañerismo.

Se ha abordado el amplio interrogante de la diferenciación, que ha sido estudiado desde distintos puntos de vista, por un grupo de personas ilusionadas por su primer trabajo, el cual iba a constituir sus tesis doctorales.

Por ser un modelo simple de diferenciación, se eligió como materia de trabajo, la papila circunvalada central de la rata y nos pareció conveniente abordar el tema desde el nivel más bajo posible. Partiendo de cero, empezamos por estudiar la morfología de la papila en detalle, así como sus reacciones ante distintas técnicas histoquímicas, para corroborar lo que ya había sido descrito, y después hemos repetido experimentos realizados por otros autores. Estos experimentos nos han permitido, en unos casos, revalorizar conclusiones que habían sido dadas hace mucho tiempo y que habían quedado olvidadas. En otros casos, hemos estado de acuerdo con las afirmaciones establecidas por los investigadores que trabajan en nuestro mismo tema, o nos hemos permitido poner en tela de juicio ciertas opiniones.

Todo esto nos ha llevado a plantearnos nuestros pro-

pios interrogantes y a realizar experimentos originales, para poder contestarlos. Como consecuencia, hemos llegado a una serie de conclusiones nuevas, pero también dejamos una vía abierta de problemas por resolver.

Para adquirir una experiencia práctica integral, se realizaron en conjunto la mayoría de los experimentos, pero el volumen de trabajo resultó ser demasiado grande y se hizo necesaria una división de este trabajo en distintos temas.

La integración del sistema ha sido dirigida y llevada por el Dr. Eduardo Rodríguez-Echandía a quien tengo que manifestar el mayor de mis agradecimientos por sus enseñanzas y ayuda constante.

También quiero expresar un gran agradecimiento al Dr. Fernando Reinoso-Suárez, director del Dpto. de Morfología de la Facultad Autónoma de Medicina de Madrid, que me ha dado la oportunidad y el apoyo necesarios para realizar esta tesis.

Así mismo, manifiesto mi gratitud a todas las personas del Dpto. de Morfología, donde ha sido realizada esta tesis, por sus sugerencias y, especialmente, a M^a Teresa Fernández Yuste que ha intervenido en la realización de los trabajos fotográficos.

Debo agradecer también al Dr. Rodríguez-Delgado, director del Dpto. de Fisiología de esta Facultad, el habernos permitido la utilización de algunos aparatos, y tengo que mencionar de una manera señalada mi reconocimiento a Pilar Malo y Magela Laviña por su colaboración en la pues

ta a punto de las técnicas histoquímicas.

Capítulo 2. ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS

De los llamados "receptores sensoriales", los responsables del sentido del gusto son los corpúsculos gustativos. En los Mamíferos, estos corpúsculos se encuentran prácticamente distribuídos por toda la mucosa oral y parte de la faringe, pero se agrupan preferentemente en estructuras especiales de la superficie dorsal de la lengua, representadas por las papilas circunvaladas, foliadas y fungiformes. Estas papilas linguales fueron ya descritas por Malpighii, en el siglo XVII. Las papilas circunvaladas pueden presentarse como estructuras simples (rata), dobles (conejo), o múltiples (hombre); contienen botones gustativos en sus superficies laterales y paredes del surco. El número de estos botones varía mucho de una especie a otra y también existen diferencias individuales (Whiteside, 1927). Las papilas foliadas están situadas lateralmente y un poco por delante de las circunvaladas, formando grupos de 4 ó 5 pliegues, en los cuales, los botones gustativos están colocados sobre las superficies laterales. Las papilas fungiformes están repartidas sobre el dorso de la lengua, son anteriores a las papilas foliadas y contienen como norma, un solo botón en la superficie dorsal (Whiteside, 1927). Las papilas filiformes, se distribuyen por toda la superficie de la lengua y carecen de botones gustativos.

El epitelio lingual, está innervado por las fibras gustativas de la cuerda del tímpano y del nervio glossofaríngeo. Los botones gustativos de la parte anterior de la lengua, están innervados por las fibras de la cuerda del tímpano homolateral; la mayoría de las papilas fungiformes y filiformes, están situadas más o menos lateralmente, pero pueden encontrarse, ocasionalmente, papilas en la línea media; estas papilas pueden tener una doble innervación. En la rata, las fibras de la cuerda del tímpano, no están relacionadas con la papila circunvalada central, la cual está innervada por ambos nervios glossofaríngeos (Whiteside, 1927). Los trabajos de Zander (1897) y Vastarini-Cresi (1915), muestran que existe un entrecruzamiento de las fibras preterminales del noveno par. Según estos autores, la superficie de la papila está innervada por ambos nervios glossofaríngeos, mientras que los botones gustativos de las paredes del surco, reciben fibras solamente del nervio homolateral. Sin embargo, los experimentos de Whiteside (1927), indican que los botones gustativos de las paredes del surco circunvalar, no están innervados exclusivamente por el nervio homolateral, sino también por el contralateral. En el caso de las papilas foliadas de la rata, tanto los nervios glossofaríngeos como las fibras de la cuerda del tímpano, innervan los pliegues papilares (Whiteside, 1927). La morfología de las papilas linguales y su sistema de innervación, ha sido recientemente descrito en detalle por Fernández (1977).

Los botones gustativos fueron estudiados en Peces te

leósteos por Schulze (1863) y algo más tarde en Mamíferos por Loven (1867) y Schwalbe (1867). El desarrollo embriológico de los botones gustativos humanos, fue analizado por Hoffman (1874) y trabajos similares fueron realizados después por Lustig (1884) y Stahr (1910). La mayor parte de los botones gustativos está formada por grupos de células reunidas en un cuerpo con forma de botón, que se abre al exterior por un pequeño poro apical. Los primeros investigadores, distinguieron dos tipos de células en el botón: las células gustativas, que tendrían carácter sensorial y contactarían con las llamadas fibras nerviosas gustativas, y las células de soporte, que estarían localizadas principalmente en la periferia del botón. Tuckerman (1889), fue de la opinión de que las células de los botones gustativos son de origen neural, pero Gräberg (1898), postuló que estas células se originan de un ensanchamiento de las células epiteliales basales. Marchand (1902), apoyó estas afirmaciones de Gräberg y estableció, además, que las células basales crecen bajo una influencia neural. Esta última opinión sobre el origen de las células que forman el botón gustativo es la que ha sido mantenida hasta el momento presente por la mayoría de los autores que han trabajado sobre este tema.

Los órganos del gusto han sido estudiados por varios autores tanto con microscopía óptica como con microscopía electrónica, en las papilas gustativas de distintas especies animales, incluyendo al hombre.

Todos los botones gustativos son estructuralmente se

mejantes, pero varían en cuanto al tamaño y al número de sus células y también en detalles de menor importancia. Beidler (1969), cuenta 59 células por botón en las papilas fungiformes de la rata, lo cual concuerda con conteos hechos también en botones de rata por Farbman y Yonkers (1971), que dan de 50 a 56 células. Muchos autores estiman que el número de células en los botones gustativos de vertebrados oscila entre 30 y 80, aunque en algunos animales, como por ejemplo la salamandra, el número de células es el doble que en otras especies (50 a 100). Las células gustativas de la salamandra son muy largas y anchas, por lo que, en este caso, los botones son muy grandes (Farbman y Yonkers, 1971).

En algunos botones gustativos, concretamente en los de la papila circunvalada del perro, se han visto espacios vacíos, tanto con microscopía óptica como con electrónica. Estos espacios están circundados directamente por la membrana plasmática de las células del botón y representan, por lo tanto, espacios intercelulares alargados. En el conejo, los capilares sanguíneos que rodean los botones se encuentran muy próximos a estos espacios intragemales (Baradi y Bourne, 1953). Algunas fotos a microscopía electrónica de Murray y Murray (1960), muestran claramente la presencia de espacios intercelulares entre las células de los botones gustativos de la papila circunvalada del mono, aunque esto no se menciona en el texto de su trabajo, como tampoco lo mencionan los autores que han estudiado con detalle los correspondientes botones gustativos.

Esto sugirió que podrían actuar como reservorios de fluidos que, procedentes de los capilares, saldrían al exterior vía espacios intercelulares y poros gustativos apicales (Baradi, 1965). Mattern y Paran (1974), estudiaron papilas fungiformes de ratón "in vivo" y pudieron observar la salida efectiva de fluidos a través del poro apical, en respuesta a vapores de ClH.

Los capilares que rodean a los botones podrían contribuir, además, al drenaje de los botones gustativos a través del poro basal. Aunque los espacios vacíos intragemales aparecen a veces como artefactos, se han visto también, con microscopía electrónica, espacios intercelulares, conocidos como canales interfaciales, en otros epitelios, y éstos son considerados reales (Bloom y Fawcett, 1962).

No se puede descartar la posibilidad de que la estructura de los botones cambie de un tipo de papila a otro, y entre las distintas especies animales. Gräberg (1899), llamó la atención sobre el hecho de que los botones gustativos no son estructuras sólidas, sino que sus células están separadas unas de otras por espacios intermedios, habiendo, además, espacios libres en el tejido que rodea al botón. Según este investigador, los espacios se comunican unos con otros y conectan con el exterior a través del poro gustativo; este sistema puede ser el medio de irrigación y depuración del botón gustativo. Más recientemente, se ha considerado que este hallazgo puede constituir un sistema para bañar extensivamente al botón con un medio

fluido adecuado, tal como existe en receptores de distinta naturaleza (husos neuromusculares, corpúsculos de Meissner). De acuerdo con Baradi (1965), la ultraestructura de las células de los botones sugiere una falta de actividad metabólica y de posibilidad de síntesis; en este caso, el sistema de espacios intercelulares puede representar un mecanismo para proveer a las células de los botones con un excedente alimenticio que subsanaría su moderada actividad metabólica (Baradi 1965). Este criterio no es compartido por otros autores.

Existen en la literatura muy pocos trabajos ontogénicos sobre los botones gustativos. Hellman (1922), estudió la embriología de los botones y sus nervios en el hombre. Determinó que se forman botones primitivos en estadios precoces, los cuales permanecen durante un periodo de tiempo corto, para luego desaparecer y ser reemplazados por los botones definitivos del adulto. Hellman (1922), mantiene que, ya en la séptima semana del desarrollo embrionario humano, aparecen los primeros botones gustativos primitivos, aunque según otros autores los botones se desarrollan entre el segundo y el séptimo mes. De acuerdo a Hellman (1922), a las once semanas están ya formados los presuntos botones por células que se tiñen de manera diferente que las células basales que los rodean. Entre las doce y catorce semanas, estas células se alargan y penetran hacia la superficie del epitelio. El epitelio superficial que las rodea forma el poro gustativo. Se puede decir que los botones tienen ya la forma definitiva en la quincuagésima

sima semana. Las células que los forman alcanzan la altura de la superficie del epitelio y pueden penetrar en el tejido conectivo de la papila. Se presentan "pelos gustativos" en el extremo apical de las células del botón que se extienden en el interior del poro. Hasta la vigésima semana, algunos botones pueden hacerse más complejos. Así, pueden encontrarse algunos con poros gustativos múltiples y asimétricos; otras veces se unen dos botones y quedan yuxtapuestos, o se reúnen varios para formar una estructura complicada. Hay en estos botones diversos tipos celulares que representan, probablemente, diferentes estados funcionales de las células (Bradley y Stern, 1967).

También se ha descrito el desarrollo ultraestructural de los botones gustativos en la rata. Según esta descripción, el poro apical aparece el día doce después del nacimiento, al mismo tiempo que se hacen visibles las llamadas células del tipo II. Esto parece indicar que estas células están implicadas en la formación y mantenimiento del poro gustativo (Farbman 1965a).

Beidler (1969, 1970) y Graziadei (1969), describieron la morfología de los botones gustativos en las papilas fungiformes de Mamíferos vistas con microscopía de scanning. El poro apical de estos botones está situado en la mitad de una depresión cónica formada por células epiteliales escamosas.

La microscopía óptica permitió, hace tiempo, distinguir por lo menos dos tipos de células en los botones gustativos, aunque algunos contienen también leucocitos, he-

cho éste que sugirió la existencia de procesos degenerativos espontáneos (Ranvier, 1889 y von Lenhossek, 1893). En la base de los botones es frecuente observar figuras mitóticas (Hermann, 1889). Otros anatomistas describieron más de dos tipos de células en los botones gustativos, y este descubrimiento, junto con la observación de leucocitos y figuras mitóticas, sugirió que los diversos tipos de células de los botones representarían diferentes estados de un mismo tipo celular. Estas células sufrirían procesos de envejecimiento y recambio a intervalos determinados (Kolmer, 1910; Retzius, 1912; Heidenhain, 1914). Sin embargo, en muchos animales, y también en el hombre, los botones gustativos linguales están sometidos a agresiones producidas al comer o por choques contra los dientes o con el paladar duro; las células gustativas pueden ser así alteradas o destruidas directamente sin daño previo alguno. En cualquier caso, todo indica que las células gustativas se están renovando continuamente. Esto hizo estudiar a Beidler y Smallman (1965), el origen de las nuevas células gustativas, sus características y su período medio de vida. En sus experimentos autoradiográficos en papilas fungiformes de rata, estos autores dejaron bien establecido que la vida media de las células gustativas es de aproximadamente 250 ± 50 horas, y que las células nuevas entran al botón en una proporción de una cada diez horas; para que las células de cada botón mantengan números constaⁿtes deben degenerar, por lo tanto, en la misma proporción. Cuando la nueva célula entra al botón, se inervaría

con terminaciones nerviosas locales y se diferenciaría luego como una célula gustativa con microvellosidades apicales. De esta manera, las células ya maduras participarían en la fisiología del gusto, pero irían paulatinamente envejeciendo hasta desaparecer en un promedio de aproximadamente 250 horas (Beidler y Smallman, 1965). Otros datos, tomados en la papila foliada del conejo, indican que la renovación de las células de los botones de este animal es semejante, aunque ligeramente más baja que la indicada en la rata (de Lorenzo, 1963).

Con las consideraciones anteriores, se puede afirmar que las células corpusculares que son renovadas continuamente son realmente células sensoriales gustativas. Si estas células se diferencian, crecen y mueren, es posible que presenten cambios en su sensibilidad a varias cualidades gustativas a lo largo de su vida. Según Beidler y Smallman (1965), las células jóvenes podrían ser más sensibles a los sabores dulces, y las células viejas lo serían a los amargos. Estos cambios resultarían de cambios moleculares en la estructura de la membrana plasmática. Además, cuando una nueva célula entra al botón, es probable que la fibra nerviosa más próxima envíe una expansión axonal para hacer contacto con ella; cuando la célula envejece se mueve hacia la región apical del botón, por lo que diferentes axones podrían inervarla sucesivamente. Las células gustativas individuales de la población total estarían en flujo continuo, pero la población como un todo mantendría estáticas las características de los

botones gustativos (Beidler y Smallman, 1965).

Las observaciones realizadas por los autores mencionados anteriormente sobre la existencia de distintos tipos celulares dentro del botón gustativo han sido confirmadas y ampliadas por numerosos trabajos efectuados con microscopía electrónica. La ultraestructura de los botones gustativos fue estudiada primeramente en el conejo por Engström y Rytzner (1956), Trujillo-Cenoz (1957) y de Lorenzo (1958). Este último autor, tomando como material de trabajo la papila foliada del conejo, ratificó primeramente con microscopía óptica las observaciones de Retzius (1912) y Heidenhain (1914). Los botones están agrupados en la papila, pero separados por un pequeño septo de epitelio. Cada botón está rodeado por células alargadas que, en la parte apical, forman la pared del poro gustativo. Las células de soporte tendrían núcleo grande y citoplasma vacuolizado y pálido, estas células no están restringidas a la periferia del botón sino que se reparten uniformemente. Las presuntas células gustativas contienen núcleos ovales alargados que son más densos que los de las células de soporte, su citoplasma es granular y denso y las terminaciones apicales de estas células están rematadas por procesos cuticulares (de Lorenzo, 1958). La microscopía electrónica reveló a este autor que los botones están rodeados por una cápsula y que las células gustativas difieren esencialmente de las epiteliales vecinas. Las células de la cápsula son más densas que las epiteliales y tienen forma elipsoidal. Forman una capa de aproximadamente dos a tres

micras de espesor que circunscribe a cada botón. Sobre las porciones apicales de estas células hay una capa de epitelio cornificado, a través del cual el poro gustativo comunica con la cavidad oral. Dentro del botón, de Lorenzo (1958), reconoció, con microscopía electrónica, dos tipos de células que fueron identificadas como gustativas y sustentaculares. Las células gustativas se encuentran mezcladas con las células de soporte y se puede distinguir en ellas regiones basal, media y apical. La región basal contiene un núcleo alargado en el que se ve un nucleolo. La membrana nuclear tiene una configuración típica y presenta pocos poros. En el citoplasma basal se encuentran también mitocondrias, unas pocas membranas de retículo endoplásmico y un aparato de Golgi poco desarrollado; los ribosomas del citoplasma están repartidos en rosetas. En la parte media se ven los elementos usuales del citoplasma y gránulos densos que miden alrededor de 0.1 micras de diámetro y que se presentan en gran número. En la región apical, los elementos del citoplasma no entran en el extremo final de la célula, pero llegan a poca distancia de la punta, donde se ven, sin embargo, numerosas vesículas y algunos gránulos pequeños en la región del poro gustativo. La membrana plasmática del extremo periférico contiene sobre su superficie numerosas microvellosidades; una sustancia extremadamente densa ocupa la mayoría de los espacios entre las microvellosidades; este material opaco representaría la antigua "sustancia mucóide" de Ranvier. Frecuentemente, la membrana plasmática de las

células gustativas se interdigita con las células adyacentes y hace prominencia en la región apical.

Siempre de acuerdo a de Lorenzo (1958), las células sustentaculares se caracterizan por sus núcleos claros y grandes. Su citoplasma contiene los elementos usuales; las mitocondrias son semejantes a las de otros tejidos, contienen grandes extensiones de sacos ergastoplásmicos y también pequeños gránulos y vesículas. La característica más llamativa de este tipo de células es la relación de sus membranas plasmáticas con las fibras nerviosas que penetran al interior del botón. Las fibras hacen sinapsis con las células gustativas y están rodeadas por la membrana plasmática de las células de soporte; de esta manera, los mesoaxones están separados de las fibras nerviosas por las membranas plasmáticas de las células de soporte (de Lorenzo, 1958).

Desafortunadamente, no ha sido posible establecer categóricamente cuál de las células del botón representa a las verdaderas células gustativas. Para algunos investigadores, las células oscuras serían los elementos receptores (de Lorenzo, 1958; Beidler, 1965), mientras que para otros lo serían las células claras (Murray y Murray, 1967). El número de tipos de células en los botones gustativos de la papila foliada del conejo y su significación funcional han sido tópicos de desacuerdo entre los investigadores. Ciertos aspectos de estos botones, en particular la morfología de las partes apicales, la complejidad de las expansiones citoplasmáticas de las partes basal y

media de las células y la relaciones entre nervios y células, no han podido ser adecuadamente resueltas con el microscopio de luz.

La mayoría de los estudios ultraestructurales de los botones gustativos de Mamíferos se refieren a las papilas circumvaladas o foliadas. Solamente existen unos pocos trabajos sobre los botones gustativos de las papilas fungiformes de la rata (Farbman, 1965a, 1965b; Beidler, 1969, 1970; Murray y col., 1972), ratón (Mattern y Paran, 1974), conejo (Murray, 1969, 1971, 1973; Murray y Murray, 1970, 1971; Graziadei, 1969) y hombre (Paran y col., 1975).

Con microscopía electrónica se ha podido reconocer que hay tres tipos de células en estos botones, las cuales tienen un periodo de vida limitado. Su renovación se realizaría por medio de proliferaciones mitóticas de las células perigemales que forman las márgenes del botón. Se ha sugerido la existencia de una metamorfosis de las células del botón, desde las formas menos diferenciadas a las más maduras. Los tres tipos celulares de los botones serían el resultado de la evolución de un solo tipo de célula, o bien de tipos completamente distintos (Murray y col., 1969).

Se ha sugerido que, puesto que estas células parecen tener funciones distintas, serían tipos celulares diferentes. Las células oscuras parecen tener una actividad secretoria que no poseerían las células claras; estas últimas presentan contactos especializados con los nervios. El tercer tipo de célula diferiría de los otros dos por

su contenido en vesículas densas, sus masas de vesículas apicales y por carecer de microvellosidades libres. Es probable que las células oscuras representen los tipos menos diferenciados, pero no se sabe si desde ellas hay dos líneas de desarrollo a células claras y células del tercer tipo, o si una es un estado más avanzado, en la evolución, de la otra. Sin embargo, no hay evidencias de una transición entre las células oscuras y las células tipo III (Murray y col., 1969). En los botones de la papila foliada del conejo, las células claras nunca tienen los centriolos en el ápice, pero las células oscuras y las del tercer tipo si poseen esta característica; también es significativo el hecho de que el aparato de Golgi aparece en posición supranuclear en las células oscuras y en las del tipo III, mientras que en las células claras está por debajo del núcleo. Parece entonces probable que las células del tipo III se desarrollen a partir de las células oscuras y que representen una línea de desarrollo distinta de las células claras (Murray y col., 1969). Las vesículas sinápticas de las células tipo III son semejantes a las que han sido descritas como elementos colinérgicos, mientras que el aspecto de las vesículas densas de las células oscuras y del tipo III, parece corresponder a vesículas donde se ha demostrado que hay catecolaminas. La similitud de las cisternas del retículo endoplásmico con ciertas vesículas, sugiere que éstas pueden proceder del retículo endoplásmico; además, la extensión del retículo endoplásmico desde el ápice hasta las regiones basales y la presencia de las vesí

culas justo en el fondo de la célula, ha sugerido la posibilidad de que una sustancia, particularmente iones, que entrara en la célula por la membrana apical, podría ser transportada por el retículo endoplásmico y aparecer, eventualmente, en las regiones más profundas (Murray y col., 1969). En la papila circunvalada del conejo, las células tipo III del botón también muestran la presencia de estas vesículas densas y sinápticas, mientras que las de las papilas fungiformes, aunque de morfología diferente, muestran masas de vesículas sinápticas en relación con las terminaciones nerviosas (Murray y col., 1969). Las células tipo III de los botones gustativos del mono, presentan las mismas características (Murray y Murray 1960). Una relación similar de las vesículas pequeñas con las terminaciones nerviosas ha sido dada por Farbman (1965), en lo que él llamó "células basales" , en los botones gustativos de las papilas fungiformes de la rata, aunque no designó estas regiones como propiamente sinápticas. En un estudio de botones gustativos de la papila circumvalada de la rata, Uga (1969), encontró vesículas de típica configuración presináptica, adyacentes a las terminaciones nerviosas, en las células de tipo claro. Es posible, sin embargo, que éstas fueran células tipo III.

Farbman (1965), da cuatro tipos de células en los botones fungiformes de la rata; dos de ellas, las periféricas y las basales, fueron postuladas como precursoras de los dos tipos restantes de células; las células tipo I y tipo II están localizadas centralmente dentro del botón,

extendiéndose desde el poro apical, donde terminan en microvellosidades, hasta la base del botón donde son talaradas por fibras nerviosas amielínicas. Las células tipo I han sido descritas como células receptoras en varios estudios; las células tipo II, se cree que cumplen alguna función en el desarrollo y mantenimiento del poro gustativo.

En el trabajo ultraestructural de Gray y Watkins (1965), se describen algunas observaciones nuevas referentes a los extremos apicales de las microvellosidades de las células gustativas; éstas microvellosidades se dilatan y salen fuera del poro, por lo que representan una expansión de la superficie de la membrana y, sin duda, una gran área receptiva de transducción. Sin embargo, en estas estructuras, la membrana no parece especializada y los organoides citoplasmáticos parecen estar ausentes en las dilataciones.

Murray y Murray (1970) y Murray (1971), observaron células tipo I y II similares, en los botones gustativos de la papila fungiforme del conejo. Además, observaron células tipo III en botones foliados (Murray y col., 1969). Las células tipo III contienen vesículas densas y claras, y vesículas sinápticas cerca de fibras nerviosas que contactan con su mitad basal. Aunque las células tipo III pueden ser identificadas en la parte apical de los botones fungiformes, así como en la parte contraria en los botones foliados, están consideradas como probables células receptoras.

Murray (1973), da cuatro tipos de células en los botones gustativos de Mamíferos. El tipo I (células oscuras) contiene vesículas secretorias, el tipo II (células cla-ras) tiene numerosas microvellosidades apicales. Las células tipo III, que se considera que son los receptores gustativos primarios, tienen un delgado y largo proceso apical. Las células tipo IV son las células basales. Estos tipos han sido reconocidos, principalmente, en botones gustativos de las papilas foliadas. El material denso en el poro del botón de la papila foliada, derivaría de las vesículas de las células tipo I. Fujimoto (1973), considera que las membranas limitantes de las vesículas derivadas del Golgi, en las células tipo I y II, se incorporarían a las membranas apicales (exocitosis). Los poros contienen, además, pequeñas vesículas irregulares con membrana plasmática y fragmentos de membranas, lo que indicaría una secreción adicional de tipo merocrino.

Uno de los más recientes trabajos sobre la ultraestructura de los botones gustativos, ha sido realizado por Takeda y Hoshino (1975). Estos autores estudiaron todas las papilas de la lengua de la rata. En la papila circunvalada, las células tipo I contienen numerosos ribosomas, retículo endoplásmico rugoso y complejo de Golgi bien desarrollado. Las cisternas del Golgi contienen gránulos densos parecidos a los observados en el citoplasma apical. Ocasionalmente, la membrana de los gránulos se fusiona con la membrana plasmática y el contenido de estos gránulos confluye con el espacio intercelular (exocitosis).

Esto indica que los gránulos densos son precursores secre torios de la sustancia del poro, como ya había sido sugeri do por Trujillo-Cenoz (1957), Nemetschek-Gansler y Ferner (1964), Murray y Murray (1967) y Scalzi (1967). Además, los gránulos intracelulares y la sustancia densa del poro tienen una reacción común PAS positiva. Se cree que esta sustancia puede tener un papel importante para facilitar y modificar la respuesta de las células a los impulsos gustativos (Murray y Murray, 1970).

De Lorenzo (1958) y Farbman (1965), habían designado como células gustativas, a las células tipo I (células os curas) de Takeda y Hoshino (1975). Sin embargo, otras ob servaciones sugieren que la función de las células tipo I es principalmente de síntesis y secreción de la sustancia del poro, y su papel en la transducción sería indirecto. (Takeda y Hoshino, 1975).

En las células tipo II hay abundante retículo endo plásmico y vesículas por todo el citoplasma; estas últimas son semajantes a las del interior del poro, lo que sugiere que vesículas y membranas libres, en los poros, pueden ori ginarse en las células tipo II. Takeda y Hoshino (1975), sugieren que no hay contacto entre los nervios y las célu las tipo II.

Las células tipo III se distinguen de los otros tipos de células por la presencia de vesículas densas y claras, ambas formando agregados en el citoplasma adyacente a las fibras nerviosas. Murray y col. (1969), describieron en el conejo, que los contactos de las células tipo III con los

nervios, representan sinapsis químicas típicas, y así las designaron como células receptoras gustativas. En los botones gustativos de la rata, los contactos sinápticos entre los nervios y las células del botón son contactos atípicos, solo en las células tipo III se ha podido establecer que hay contactos sinápticos con los nervios, lo que sugiere que son las células tipo III las involucradas en la transucción del estímulo gustativo (Takeda y Hoshino, 1975).

La ultraestructura de los botones foliados en la rata, corresponde a los de la papila circumvalada, mientras que los botones fungiformes difieren en la ultraestructura de sus regiones apicales. También los poros de los botones fungiformes contienen numerosas vesículas, pero el citoplasma apical de las células tipo I termina en microvellosidades cortas y contiene gránulos de densidad moderada así como gránulos densos. Murray y Murray (1970), supusieron que esta diferencia puede deberse a diferente inervación o a una localización más expuesta de los botones en la superficie de las papilas fungiformes. Sin embargo, no hay diferencia ultraestructural en los botones de los pliegues anteriores y posteriores de la papila foliada, aunque estos botones están inervados por nervios parcialmente diferentes (Oakley, 1967). Por otra parte, los botones más expuestos, cercanos a la superficie oral de las papilas foliadas, difieren, en ciertos aspectos, de los situados más profundamente en los surcos. Los primeros son similares a los botones fungiformes, por lo que la exposición de los botones al medio oral parece ser el

factor determinante de las diferencias estructurales. También es posible que estas diferencias ultraestructurales en la región apical del botón reflejen diferencias fisiológicas (Takeda y Hoshino, 1975).

La ultraestructura de los botones de la papila fungi forme humana es semejante a la de otras especies animales. Son constantes los tres tipos de células básicas (I, II y III). En resumen, podemos decir que todos los botones de Mamíferos hasta ahora estudiados son esencialmente semejantes, y están constituidos por los mismos tipos celulares, los cuales presentan diferencias menores de acuerdo a su localización en las diferentes papilas. Las células tipo I de las papilas foliadas, circunvaladas y fungiformes tendrían una función secretora. Las células tipo III son consideradas como los candidatos más probables de receptores gustativos. Esto se basa en la gran acumulación de gránulos densos y vesículas sinápticas, particularmente en las mitades basales de estas células, donde hacen contacto con fibras nerviosas. Algún espesamiento de la membrana plasmática de la célula tipo III ha sido también observado en los sitios de contacto (Murray, 1973). En contra de la opinión de Takeda y Hoshino (1975), Farbman (1965a), sugiere que las células tipo II son muy activas metabólicamente. Se han visto bandas de tonofilamentos desde el ápice a la base de estas células (Mattern y Paran, 1974), y recientemente se han presentado algunas evidencias morfológicas de un mecanismo contractil en botones fungiformes. Mattern y Paran (1974), especulan que las cé

lulas claras (tipo II) podrían ser elementos contráctiles con función potencialmente protectora. El poro gustativo contiene microvellosidades de los tres tipos de células y sustancias y/o vesículas extracelulares densas.

Las fibras del sistema de inervación de la papila y los botones, responden positivamente a la reacción de AChE. La actividad AChE positiva en fibras nerviosas finas localizadas bajo los sitios de formación de los botones, aparece ya el día 16 del desarrollo embrionario del ratón (State y Bowden, 1974), seguida de la aparición de los botones. Esto sugería ya una actividad de los botones durante la gestación, pero después del nacimiento, los botones desaparecen de la misma manera que la actividad enzimática, para volver a reaparecer entre los días ocho y diez de vida postnatal (State y Bowden, 1974). Estos fenómenos no han sido explicados convenientemente.

Se han hecho un número de pruebas para localizar las sustancias neurotransmisoras en los botones de vertebrados, especialmente la ACh a través de la identificación histoquímica de su enzima hidrolítica, la AChE.. Estudios con microscopía electrónica en varias especies de vertebrados, han revelado la presencia de AChE en los plexos nerviosos subgenuales, algunos de cuyos elementos penetran en la base del botón (Baradi y Bourne, 1959; Elis, 1959; Hodosh y Montagna, 1963; Vij y col., 1972). También se observó actividad esterásica no específica en otras áreas (Elis, 1959; Hodosh y Montagna, 1963). En los propios botones solo se ha observado actividad AChE específica en asociación con

nervios intragemales (Elis, 1959; Vij y col., 1972), o en las que fueron interpretadas como células gustativas (Elis, 1959; Hodhos y Montagna, 1963). Más recientemente, se describió la existencia de actividad AChE a nivel de los poros apicales (Paran y Mattern, 1975), lo cual indicaría que esta enzima está presente también en las microvellosidades. Además, se sabe que unos pocos nervios subgemales, que parecen ser adrenérgicos, son también AChE positivos (Gabella, 1969).

Estudios histoquímicos recientes con microscopía electrónica, han confirmado las observaciones de AChE en el plexo nervioso subgemaal (Scalzi, 1967; Murray y Fujimoto, 1970; Jahnke, 1972; Paran y Mattern, 1975), pero no dejan claro como es la distribución intragemaal de la enzima. Scalzi (1967), encuentra AChE en el espacio entre fibras nerviosas y células gustativas. Murray y Fujimoto (1970), establecen la actividad de la AChE alrededor de los nervios que penetran en la base del botón y sobre las membranas de las células tipo I y II, particularmente en los sitios de contacto con las fibras nerviosas. Las células tipo III contienen, además, productos de reacción en el retículo endoplásmico rugoso, en la membrana nuclear y, posiblemente, en algunas de las vesículas densas. Jahnke (1972), también encuentra actividad AChE relacionada con algunas células propias del botón. Este autor sugirió que los botones contienen axones AChE positivos y axones negativos. Las células tipo I están en contacto con ambos tipos de axones, las células tipo II, principalmente con axones

AChE positivos y las células tipo III son negativas para la AChE en las sinapsis; su cuarto tipo de células, las células de glicógeno, tampoco muestran normalmente AChE en los puntos de contacto con los axones. Los estudios ex puestos por Landgreen (1954), Skouby y Zilstorff-Pedersen (1955), Sakai (1965), Sakai y Ozawa (1965) y Ozeki y Noma (1972), indican que la ACh y los inhibidores de AChE mo- dulan sustancialmente los procesos gustativos. La ACh es tá generalmente proyectada como función de neurotransmisor en las uniones mioneurales y ciertas sinapsis. Sin embar- go, la AChE se encuentra normalmente distribuida a todo lo largo de los nervios colinérgicos. Nachmansohn (1970, 1971) y Neumann y col. (1973), han tratado de explicar la pre- sencia generalizada de la AChE en las fibras nerviosas, como debido a que esta enzima es necesaria para la trans- misión del impulso nervioso a través de una sinapsis y también para su propagación a lo largo de los axones. La localización de AChE en concentraciones relativamente al tas en el poro apical de los botones, es compatible con las microvellosidades tapizadas por membranas excitables. Estas microvellosidades han sido implicadas en los esta- díos iniciales del proceso gustativo (Paran y Mattern, 1975). Sin embargo, Duncan (1963a,b, 1964), sugiere que en las sinapsis receptoneurales de este sistema, el neu- rotransmisor no es la ACh.

En resumen, tanto los nervios como las células sen- soriales de los botones de la papila circunvalada central de Mamíferos, presentan actividad AChE, pero se desconoce

hasta el momento la significación funcional de la enzima en el sistema gustativo.

Observaciones histoquímicas han revelado la existencia de tres clases de actividad de la fosfatasa, localizada en la región gustativa de la lengua (Iwayama y Nada, 1967a,b): la ATPasa y la fosfatasa ácida se encuentran específicamente en las células del botón, mientras que la fosfatasa alcalina está presente en las células superficiales del epitelio de revestimiento del surco de las papilas circunvaladas y foliadas, y no parece tener una relación específica con las células del botón. En cuanto a la actividad enzimática del sistema papilar durante la degeneración, la fosfatasa alcalina, que está normalmente localizada en la capa superficial del epitelio que cubre los surcos de la papila circunvalada, disminuye gradualmente cuando los botones degeneran y reaparece si se produce su regeneración. La actividad empieza a disminuir tres días después de la operación, alcanzando el punto más débil diez días más tarde, y reaparece a partir del día 25 (Iwayama y Nada, 1969). La actividad de la fosfatasa alcalina del epitelio gustativo ha sido indicada histoquímicamente por varios autores (Bourne, 1948; Baradi y Bourne, 1951, 1953, 1959; Rakhaw, 1962; Baradi y Brandes, 1963). Esta enzima está dotada con papeles importantes en la percepción del gusto, pero falta, sin embargo, en las papilas fungiformes. La actividad enzimática no puede ser producida por las células escamosas del epitelio de cubierta. Rakhaw (1962), muestra una alteración paralela de acuer

do a las transformaciones del botón, por lo tanto, parece razonable admitir que casi toda la fosfatasa encontrada en la descamación epitelial, debe ser originada por las células del botón (Iwayama y Nada, 1969). La función secretoria del botón se había demostrado por la existencia de una sustancia densa que llenaba los poros gustativos y por gránulos secretorios de la misma naturaleza en las células del botón (de Lorenzo, 1958, 1963; Murray y Murray, 1967). Las papilas circunvaladas y foliadas, que tienen muchos botones, tienen el producto de secreción en la superficie, pero en las papilas fungiformes, que tienen un solo botón, la secreción es escasa y fácilmente disuelta en la saliva (Farbman, 1965), aunque parte de esta actividad puede ser también debida a las glándulas linguales distribuidas en las paredes de los surcos y a veces condensadas alrededor de la superficie libre de sus conductos excretorios (Iwayama y Nada, 1969). La APTasa del botón es específica; esta reacción tiñe claramente las células del botón pero no tiñe el epitelio escamoso. Cuando se produce denervación, la actividad ATPásica persiste en las membranas de las células del botón hasta que desaparecen y degeneran. Durante la degeneración y regeneración se pudieron ver células en el botón en preparaciones teñidas con hematoxilina-eosina (Iwayama y Nada, 1969). La reacción ATPásica de las células puede observarse igualmente en el epitelio de la papila circunvalada de la rata recién nacida aunque Torrey (1940), afirma que no existen botones hasta el noveno día de vida postnatal. En la lámina propia se encontró actividad ATPá

sica a lo largo del plexo nervioso subgemal, en animales después del día 20 de la denervación, y lo mismo ocurrió en los animales observados 60 días después de la operación. Todo esto puede demostrar que mucha de la actividad asociada con las fibras nerviosas radica en las células de Schwann normales o bien en las que sobreviven "in situ" después de la denervación. Parece ser, por lo tanto, que solo existe actividad ATPásica en la papila circunvalada central a nivel de las células de Schwann de los nervios sensitivos y de las células específicas de los botones gustativos.

El análisis comparativo de los botones gustativos de los Mamíferos con los de otras clases animales, resulta indispensable para determinar, no solamente cuales son los elementos esenciales del sistema, sino también para conocer o permitir investigar el origen de las células gustativas, la universalidad de su neurodependencia y otras características.

En los Anfibios se han descrito células gustativas semejantes a las de los Mamíferos. En la salamandra se distinguen tres tipos de células en los botones: células oscuras (60%), células claras (30%) y células basales (10%). Las células claras están localizadas en la región axial de los botones y alcanzan la superficie, en el centro del área receptora apical; están virtualmente llenas de retículo endoplásmico liso, mitocondrias y aparato de Golgi. Su morfología sugiere que están relacionadas con el transporte iónico y las mitocondrias servirían como fuente de

energía (Farbman y Yonkers, 1971). La respuesta celular a los estímulos gustativos podría consistir en un flujo iónico a través del sistema de membranas expandidas (microvellosidades) y este movimiento de iones sería responsable de los cambios en el potencial eléctrico de la membrana plasmática. Mirado desde este punto de vista, la morfología de las células claras proporciona bases para la interpretación de que estas células son receptores gustativos en la salamandra (Fährmann, 1967; Murray y Murray, 1967; Uga, 1969). Estas bases son insuficientes, ya que consisten exclusivamente en que las células claras hacen contactos específicos con terminaciones nerviosas y pueden contener vesículas de tipo sináptico. Sin embargo, en esta especie (Farbman y Yonkers, 1971), estas vesículas son más grandes (1000 Å) que las vesículas sinápticas típicas que solo tienen de 400 a 600 Å (Uga y Hama, 1967; Murray y col., 1969; Graziadei, 1970).

En la salamandra, las células oscuras están tanto en la periferia del botón como esparcidas entre las células claras del centro; tienen abundantes gránulos secretorios, muchos haces de filamentos, microvellosidades, acumulación infranuclear de retículo endoplásmico rugoso y partículas densas que se tiñen con PAS, y estarían formadas por polisacáridos neutros. Esta morfología sugiere una función secretoria para este tipo de célula (Farbman, 1967; Murray y Murray, 1967; Uga, 1969), y sería, por tanto, equivalente a la célula tipo I (oscura) de Mamíferos. Las células basales se localizan en la periferia de la mitad basal del

botón y contienen vesículas características densas, de aproximadamente 700 a 900 Å de diámetro, colocadas sobre la lámina basal, pero no se observaron formas de transición entre estas células y las propias del botón (Farbman y Yonkers, 1971).

En los botones gustativos del axolote se han descrito también tres tipos de células (Fährmann, 1967; Fährmann y Schuchardt, 1967). Estas, son semejantes a las de la salamandra; las llamadas células A, por este autor, son comparables a las células oscuras, contienen microvellosidades apicales de proyecciones finas (descritas como tubulares), que se proyectan a la capa superficial filamentosa, pero no contienen gránulos secretorios densos (Fährmann, 1967); las células B son comparables a las claras por su retículo endoplásmico liso y sus mitocondrias, pero sus microvellosidades no llevan proyecciones finas; las células basales tienen también gránulos característicos. Fährmann distingue dos tipos de células basales, uno de los cuales está adyacente a la lámina basal del botón, mientras que el otro mantiene solamente un pequeño contacto con él y se mantiene más bien por fuera de la cápsula. Se han descrito formas de transición entre las células basales y las células claras, lo cual ha sugerido la existencia de relaciones evolutivas entre ambos componentes, en el axolote (Fährmann, 1967).

Recientemente, se ha podido ver que los botones gustativos del axolote contienen otras células, no descritas anteriormente, que presentan un largo proceso apical y son

similares a las células tipo III de los botones gustativos de Mamíferos (Whitear, 1976). En las células de soporte hay evidencias de decapitación periódica además de secreción por exocitosis. Fragmentos bilaminares, que tienen forma de hoja y están constituidos por dos láminas densas separadas por un espacio transparente, sobresalen de las microvellosidades apicales de las células de soporte o se encuentran separados en la capa extracelular secretada. La superficie de cubierta sobre el poro del botón gustativo en el axolote, es 4 ó 5 veces más gruesa que en el epitelio vecino y el número de fragmentos bilaminares en el área del poro es unas 100 veces mayor. Esto sugirió que la actividad secretoria de los botones es muy grande, la renovación continua del material superficial contribuiría a lavar la superficie apical, y los fragmentos bilaminares representarían un material, probablemente lipoproteico, que también participaría en el proceso de limpieza (Whitear, 1976).

Los botones gustativos de Anuros tienen forma de disco; los de la rana han sido interpretados solamente como quimiorreceptores, como quimiorreceptores asociados a mecanoreceptores o como mecanoreceptores puros (Boeke, 1934). El análisis ultraestructural de estos botones reveló que están compuestos por células sensoriales, células de sostén y fibras sensoriales conectadas a las células por medio de sinapsis (Graziadei y de Han, 1971; de Han y Graziadei, 1973; Hirata y Nada, 1975). Se pueden distinguir dos tipos de células que representarían formas maduras e

inmaduras de un mismo elemento. Las células jóvenes terminan en un pincel de microvellosidades y contienen un retículo endoplásmico liso en disposición espiralada (von Düring y Andres, 1976). Formaciones idénticas de retículo endoplásmico se encontraron en las células sensoriales del órgano de Jacobson y en las células de soporte de la mucosa olfatoria de los pájaros (Drenckhahn, 1970). Las células sensoriales jóvenes están rodeadas por fibras nerviosas pero no se han encontrado especializaciones sinápticas entre ellas. Las terminaciones nerviosas parecen inducir la diferenciación y maduración de las células gustativas o inmaduras. Las células sensoriales maduras de la rana terminan en un proceso de forma alargada; sus procesos basales establecen sinapsis con ramas de fibras nerviosas gustativas aferentes. Células glandulares y células satélites de sostén envuelven los finos procesos apicales de las células sensoriales. En la base del disco gustativo se encuentran hasta diez células de Merckel que forman un complejo con las terminaciones nerviosas. Hay dos tipos de fibras mielinizadas, grandes y pequeñas; las fibras pequeñas inervan las células gustativas y las más gruesas inervan las células de Merckel.

En Peces, algunos investigadores han descrito también dos tipos de células que llegan a la superficie del poro de los botones gustativos. Unas células tienen una proyección prominente en el ápice, encima de un cuerpo fibrilar flanqueado por vesículas, mientras que otras, presentan microvellosidades apicales y rodean a las anteriores

(Desgranges, 1966; Hirata, 1966; Whitear, 1971; Schulte y Holl, 1971, 1972). La mayoría de los autores denominan a estas células como claras y oscuras, respectivamente, dando a ambas el papel de células receptoras (Welsch y Storch, 1969; Storch y Welsch, 1970; Reutter, 1971). Las células gustativas oscuras de Peces corresponden a las células tipo I de la papila foliada de Mamíferos, cuya estructura parece ser esencialmente secretoria, al tiempo que actúan como elementos de soporte (Murray, 1973); contienen también gránulos y vacuolas claras (Desgranges, 1965; Reutter, 1971; Grover-Jhonson y Farbman, 1976). En el pez-gato se han hecho otras observaciones interesantes, tales como la ausencia de nucleolos en las células claras. Esta característica y su relativa pobreza en ribosomas citoplasmáticos, sugiere un bajo nivel de síntesis de proteínas en las células claras, lo cual no indica que sean metabólicamente inactivas, ya que contienen muchas mitocondrias y un extenso retículo endoplásmico liso. Posiblemente asociado con la ausencia de nucleolos, es la presencia de bandas anulares de filamentos en el interior del núcleo; esto sugirió que las células claras pueden tener un reducido nivel de síntesis de RNA y, por lo tanto, de proteínas (Lane, 1969; Grover-Jhonson y Farbman, 1976).

En Peces (Hirata, 1966), las células basales fueron las primeras reconocidas como un tipo de células independientes (y no como células de la estirpe de las claras y oscuras, tal como fuera sugerido por Heidenhain en 1914).

Estas células han sido estudiadas en la carpa (Huga y Hama, 1967), en *Saccobranchus* (Rajbanshi y Tewari, 1968) y también en la salamandra (Farbman y Yonkers, 1971). La convergencia de "procesos llenos de vesículas" de las células claras hacia las células basales y la estrecha asociación entre estas dos estructuras, sugiere que puede existir una relación funcional entre ellas. Aunque no se han encontrado evidencias de uniones sinápticas entre estos dos tipos de células, hay especializaciones de la membrana en forma de desmosomas (Grover-Jhonson y Farbman, 1967). La estrecha asociación entre las membranas de estas células y la presencia de vesículas en las células basales, topográficamente relacionadas con procesos citoplasmáticos de células claras también llenos de vesículas, ofrece algún apoyo morfológico a la hipótesis de Reutter (1971), de que las células basales podrían tener una función moduladora en la transmisión de la información gustativa desde las células receptoras al sistema nervioso central.

La pobreza de desmosomas y virtual ausencia de hemidesmosomas en las células basales, sugiere que pueden no ser de origen epitelial. Se ha hipotetizado que las células basales se originan en las crestas neurales y migran luego a los lugares donde se están formando los botones gustativos (Grover-Jhonson y Farbman, 1976).

Es bien conocido que en Mamíferos adultos y Peces, los órganos gustativos degeneran y desaparecen en un tiempo relativamente corto después de la sección experimental de sus nervios sensoriales (von Vintschgau y Honigschmied,

1877; von Vintschgau, 1880; Hermann, 1885; Olmsted, 1920, 1921; Brockelbank, 1925; May, 1925; Torrey, 1934; 1940; Wagner, 1953; Guth, 1957, 1958, 1963; Zelená, 1964). Si los nervios gustativos regeneran en las áreas que inervaban previamente, los botones gustativos reaparecen (Griffini, 1887; Guth, 1958; Zalewski, 1969). Normalmente, esto ocurre solo bajo la influencia de nervios sensitivos y no como respuesta a la reinervación con nervios motores puros (Guth, 1958; Zalewski, 1969). Durante el desarrollo, las células del botón gustativo se diferencian solamente después de que los nervios crecen y se introducen en el epitelio (Farbman, 1965). Estos descubrimientos han sugerido que las fibras nerviosas podrían liberar un factor neurohumoral capaz de producir y mantener la diferenciación de los botones (Olmsted, 1920; May, 1925; Torrey, 1934), y posiblemente el desarrollo temprano de los botones en el feto (Hermann, 1885; Gräberg, 1889; Farbman, 1965). Olmsted (1920), había sugerido que alguna sustancia con acción hormonal, en el hombre, era secretada constantemente por las fibras sensitivas. El estado normal de un botón gustativo se mantendría solamente el tiempo que recibiera la llegada de esta sustancia. La eliminación del sustrato cortando el nervio, era suficiente para causar la desintegración del órgano sensitivo; la restauración del nervio y con ello de su secreción, traería consigo la restauración del botón. May (1925), interpretó los resultados de sus investigaciones del mismo modo, y Parker (1931), ha sugerido que la misma explicación puede aplicarse al desa

rollo embriológico normal de estos órganos.

La sustancia o factor diferenciador se formaría en el cuerpo de la célula nerviosa y migraría a lo largo de sus prolongaciones periféricas en dirección centrífuga.

Las alteraciones que sufren los botones gustativos cuando son denervados, apoyan la hipótesis de la función trófica de los nervios en general y especialmente con respecto a las fibras sensoriales. La naturaleza de esta función es todavía desconocida e incluso la hipótesis de una acción humoral o química específica, se considera incierta (Parker, 1932; Singer, 1964; Guth, 1968). Sobre las bases de la hipótesis del paso de proteínas o nucleoproteínas desde las terminaciones nerviosas a los órganos inervados (Miani y Olivieri-Sangiaco, 1968), se puede sugerir que estas proteínas influyen en el metabolismo y producen el mantenimiento de las células gustativas. En el caso de las fibras nerviosas sensoriales, se puede señalar que su efecto trófico sobre los órganos receptores se ejerce en dirección opuesta a la conducción de los impulsos. La función trófica de las fibras gustativas se considera, además, que opera ya durante la vida embrionaria en el hombre, controlando la diferenciación de las células sensoriales correspondientes (Hermann, 1885; Torrey, 1940; Farbman, 1965b). Estudios recientes muestran también la dependencia trófica de algunas enzimas sobre la inervación integral de la papila circunvalada de la rata (Zalewski, 1968, 1969). Además, se puede señalar que, en el caso de los botones gustativos, la influencia trófica de los nervios sensoriales

llega a ser particularmente compleja debido a la rápida renovación de las células y a los procesos de diferenciación de las células epiteliales en receptores gustativos químicos (Beidler, 1963; de Lorenzo, 1963; Beidler y Smallman 1965).

La suspensión de la función trófica producida por la denervación, traería como consecuencia una falta en la diferenciación de las células epiteliales comunes en quimiorreceptores sensoriales. Después de la denervación persisten durante un tiempo las células ya diferenciadas, pero la diferenciación no continúa. De acuerdo a varios autores, las células gustativas se diferencian y maduran solamente en el caso de que los botones sean reinervados (Wagner, 1953; Guth, 1958).

La demostración de que los botones gustativos regeneran después de la excisión de la papila gustativa, indica que otras células, además de las que cubren la papila, pueden dar lugar a los botones gustativos (Zalewski, 1969). En cultivos de botones de papilas circunvaladas de rata previamente denervadas, se ha visto que los botones aparecen solamente en aquellos cultivos que contenían el ganglio craneal adicional (Farbman, 1972). Este autor no descarta la posibilidad de que las papilas hayan sido reinervadas por fibras procedentes de las neuronas ganglionares. A pesar de que las neuronas no estaban, aparentemente, en buenas condiciones, conservaban la capacidad para producir la diferenciación de los botones (Farbman, 1972). Esto apoya los experimentos de Zalewski (1970), que mostró que la

cromatolisis experimental de las neuronas del ganglio nodoso, no afecta sensiblemente a la estructura de los botones gustativos de la papila circunvalada central de la rata, "in vivo".

Estos experimentos demuestran que el efecto trófico o diferenciador de los nervios gustativos se mantiene aún cuando se produzcan alteraciones experimentales a nivel de los cuerpos neuronales correspondientes. Esto fue interpretado por Zalewski (1970), como una evidencia a favor de un proceso de síntesis de factores tróficos dentro mismo de las fibras sensitivas. Es más lógico, sin embargo, que los cuerpos neuronales alterados puedan mantener la síntesis de factores tróficos en las neuronas alteradas. Indudablemente, la síntesis proteica y de otros componentes esenciales para el mantenimiento de las fibras nerviosas, han continuado ocurriendo en estas neuronas; caso contrario, los nervios mismos habrían degenerado en su totalidad, tal como ocurre después de la sección.

Se han dado varias interpretaciones concernientes a la distribución de las fibras nerviosas y su relación con las células de los botones. En el plexo subepitelial, las fibras amielínicas están envueltas por mesoaxones de células de Schwann. Aparentemente, estas fibras van al botón introduciéndose por su poro basal. Aparecen entonces envueltas por laminillas citoplasmáticas de células oscuras (tipo I) y hacen, de tanto en tanto, contactos especializados con las células claras (tipo II) y las células intermedias (tipo III) (Fernández, 1977). Estos contactos se realizan

tanto en las regiones basales como en las apicales del bo
tón. En los botones gustativos, las vesículas sinápticas
residen en el componente postsináptico, es decir, en la
terminación sensitiva (de Lorenzo, 1958). Algunas estruc-
turas descritas por de Lorenzo (1963), como axonales, pue-
den ser perfiles de células receptoras. Las observaciones
de Gray y Watkins (1965), muestran que se encuentran, de
hecho, vesículas en los componentes pre y postsinápticos
que oscilan entre 400 y 2000 Å de diámetro y no muestran
tendencia a agregarse. Difieren en estos aspectos, de las
vesículas sinápticas de la placa motora y otras sinápsis,
por lo que no sería prudente aplicarles la designación de
vesículas sinápticas, ya que esto implica que contienen
un neurotransmisor. Sin embargo, hay una hendidura defini-
da en la sinápsis de los botones gustativos, por lo que
la transmisión debe ser necesariamente química (Gray y
Watkins, 1965). Las vesículas sinápticas descritas por
Gray y Watkins (1965), a nivel de la región presináptica
de la célula receptora, probablemente contengan el corres-
pondiente neurotransmisor. Existen evidencias en cuanto a
la naturaleza de este neurotransmisor en la rana, el cual
sería serotoninérgico, pero se desconoce la naturaleza del
mismo en los Mamíferos.

La ausencia de neurofilamentos argirofílicos en las
fibras gustativas preterminales, explica por que fue impo-
sible seguir el recorrido de estos componentes dentro de
los botones gustativos en preparaciones teñidas con el mé-
todo argéntico de Bielchowsky (Gray y Watkins, 1965), Nu-

merosos túbulos de 200 A aparecen en estas fibras (Gray y Watkins, 1965), y esto es una buena evidencia para apoyar el trabajo de Gray y Guillery (1963), sobre la ausencia de argirofilia por parte de los microtúbulos neuronales en general.

Ya indicamos anteriormente que algunos autores consideran que hay una transformación gradual dentro del botón, de células oscuras a claras pasando por un estado de células intermedias. Las células de la parte basal del botón son de citoplasma y núcleo oscuro, mientras que las células claras se localizan en regiones más apicales. Esto indica que la evolución o maduración de estas células se acompaña de cambios posicionales (Iwayama, 1970). En la denervación, las células oscuras son las primeras en desaparecer, como fue demostrado por Farbman (1969), quien sugirió, además, diferentes periodos de vida para células claras y oscuras. Otra posible explicación es que las células oscuras son las precursoras de las células claras. Si no se diferencian nuevas células en el botón después de la denervación, las células oscuras que estaban presentes en el momento de la denervación, podrían continuar evolucionando hacia células claras, de tal modo que las células oscuras serían las primeras en desaparecer (Iwayama, 1970). Con la regeneración de las fibras nerviosas, solamente las células oscuras aparecen inicialmente; células claras típicas lo hacen, aproximadamente, nueve días después. Esta secuencia de regeneración sugiere también una formación de células claras a partir de células oscuras (Iwayama,

1970), y muestra, por otra parte, que las células claras viven durante poco tiempo (poco más de un día) ya que el ciclo vital de la célula gustativa alcanza, por término medio, diez días (Beidler y Smallman, 1965).

Aunque se pueden dar otras explicaciones sobre estos resultados, se ha propuesto una secuencia continua de desarrollo de las células del botón. Las células oscuras de la capa germinal evolucionarían hasta células epiteliales claras que serían desplazadas hacia el poro apical de los botones, mientras tanto, otras van diferenciándose, por acción de los nervios sensoriales, en células oscuras y así sucesivamente. Cuando las células oscuras envejecen, cambiarían gradualmente a células claras pasando por una etapa de células intermedias; probablemente, las células claras se están descamando continuamente a través del poro apical. Esta hipótesis fue dada por Iwayama (1970).

Se han dado variaciones en el tiempo de desaparición y reaparición de los botones después de la sección del nervio, en las distintas especies estudiadas. Durante la degeneración y después de la denervación (Olmsted, 1920, 1921), se han observado muchos leucocitos intracorpúsculares, lo cual fue considerado como parte de un proceso de descamación y fagocitosis. Sin embargo, ya hemos mencionado la presencia de algunos leucocitos en los botones normales (Olmsted, 1920, 1921; Whiteside, 1926; Baradi y Bourne, 1953). Farbman (1969), observó cambios degenerativos de las fibras nerviosas preterminales 12 ó 24 horas después de la denervación, pero los nervios fueron fagocita

dos, aparentemente, por las células oscuras del botón y no por leucocitos. Es probable que los leucocitos solamente invadan los botones en ocasiones de daño excepcional o bien de daños menores debidos a agentes abrasivos o químicos que alteran por igual a todos los tipos celulares de los botones gustativos durante la ingestión de comida (Beidler y Smallman, 1965). Tal es el caso observado a nivel de los nervios periféricos donde los infiltrados leucocitarios afectan exclusivamente a los sitios lesionados, pero las fibras degenerativas distales a la lesión, son fagocitadas por las células de Schwann (Singer y Schadé, 1964, 1965; Schadé y Ford, 1963).

Ultraestructuralmente, se observan también signos de degenerativos en los botones denervados. En las células poco diferenciadas y células tipo I aparecen cuerpos densos de tipo lisosómico. Se puede presumir que la abundancia de lisosomas en las células degenerativas del tipo I, es debida, al menos en parte; a la aparición de procesos autofágicos (Schmidt, 1962). La posibilidad de que algunas de estas formaciones de tipo lisosoma puedan contener remanentes de terminaciones nerviosas fagocitadas, no puede ser absolutamente excluida, pero es probable que muchos de ellos sean lisosomas primarios típicos (Olivieri-Sangiaco, 1970).

Otro aspecto del proceso degenerativo se refiere a la organización citoplasmática de las células tipo II que de acuerdo a Olivieri-Sangiaco (1970), son más diferenciadas y degeneran más rápidamente que las oscuras. Este

autor postula que hay diferentes sustancias tróficas para ambos tipos celulares o, simplemente, diferencias en la respuesta de las células con diferentes grados de diferenciación, a un mismo factor neural.

Las observaciones y los experimentos comentados en este resumen bibliográfico, muestran que los conocimientos acerca de las características estructurales de las células gustativas, así como las peculiaridades de su sistema de inervación, se han incrementado notablemente en los últimos años como consecuencia del aporte decisivo de la microscopía electrónica. Poco se ha avanzado, sin embargo, en lo referente al origen de las células gustativas y su mecanismo de diferenciación. Un solo hecho ha sido bien demostrado: estas células son neurodependientes. El resto de las interpretaciones permanece en un plano meramente hipotético y las contradicciones entre las interpretaciones de los distintos autores no son la excepción sino la regla.

Capítulo 3. PLANTEAMIENTO

Las células gustativas representan un sistema de diferenciación neurodependiente que lleva a la formación de transductores capaces de responder selectivamente ante estímulos gustativos determinados. En este sistema, y al igual que en otros órganos sensoriales, son células receptoras especializadas las que contienen el aparato transductor. Existen sistemas sensoriales, en los cuales las terminaciones nerviosas mismas actúan como transductores, pero no es este el caso en los corpúsculos gustativos de las papilas linguales.

Los corpúsculos gustativos representan, por lo tanto, : a) un complejo sistema fisiológico relacionado con la gustación y b) un sistema relativamente simple de diferenciación celular, bajo el comando directo del sistema nervioso. Nos ha interesado este segundo aspecto del sistema.

Se sabe que los receptores acústicos, equilibratorios y otros, son estructuras neurodependientes permanentes. Si se interrumpen sus conexiones neurales, estas células neuroepiteliales degeneran en forma definitiva. No ocurre lo mismo con los corpúsculos gustativos. Si bien las células gustativas también degeneran en ausencia de inervación, estas pueden volver a diferenciarse si el epitelio correspondiente es reinervado con fibras sensitivas. Esta plasticidad de los botones gustativos hace que resulten un modelo

muy valioso para el análisis de la diferenciación neurodependiente en general.

Las células gustativas, por ser estructuras inestables, tienen un ciclo vital relativamente corto y forman parte de un sistema en el que los procesos de diferenciación (entrada) se encuentran equilibrados con los procesos de involución (salida). Los botones gustativos, cualquiera que sea su localización, constan fundamentalmente de tres tipos celulares que han sido denominados: células oscuras (tipo I), células claras (tipo II) y células intermedias (tipo III). Estas, han sido estudiadas extensivamente con microscopía óptica, histoquímica y microscopía electrónica. Sin embargo, no está aclarado en la actualidad el papel que cada una de estas células cumple en el proceso de transducción, ni tampoco su significación en el ciclo de diferenciación de los botones. Hemos visto que para de Lorenzo (1958) y Beidler (1965), las células claras son elementos de soporte, mientras que las oscuras son los receptores gustativos. Otros autores (Gray y Watkins, 1965; Murray y col., 1969; Murray y Murray, 1970; Takeda y Hoshino, 1975), opinan, en cambio, que las células oscuras del botón son las que realizan las funciones de sostén, mientras que las intermedias y las claras tendrían una función gustativa. Finalmente, para otros, los tres tipos de células podrían actuar como receptores (Rhodin, 1963).

A pesar de que la neurodependencia de los botones es un hecho indiscutible, no se conoce hasta el momento: a) el mecanismo de acción de la influencia neural, ni tampoco, b)

el o los tipos de células corpusculares sensibles a los factores neurales diferenciadores.

Otro aspecto que queda por resolver es el origen de los botones gustativos. Beidler y Smallman (1965) llegan a la conclusión de que las células epiteliales de la cápsula de los botones se dividen mitóticamente bajo el comando neural para penetrar luego en los botones y diferenciarse finalmente en células gustativas. Aunque con menos detalles, el origen epitelial de los botones había sido ya sugerido por Gräberg en 1898 y se acepta aún en la actualidad. Sin embargo, Tuckermann (1889) había apuntado 10 años antes, que las células de los botones podrían tener un origen neural y, recientemente, Reutter (1971) volvió a plantear la posibilidad de que las células intracorporales pueden tener un origen distinto al epitelial. Más aún, cuando ya habíamos iniciado nuestro trabajo, Grover-Johnson y Farbman (1976), volvieron a replantear este problema sugiriendo que las células basales de los botones serían los elementos troncales de este proceso de diferenciación y podrían derivar de las crestas neurales. Estos autores apoyan esta sugerencia más bien en consideraciones teóricas, que en datos experimentales.

Cuando proyectamos nuestro trabajo, lo hicimos en base a tres interrogantes principales:

1º) ¿Cual es el origen de las células que forman los botones gustativos?.

2º) ¿Cual es el papel de cada uno de los tipos celulares intragemales en el mecanismo de la diferenciación?. Este

interrogante involucra varios aspectos de especial interés; entre ellos: ¿los diferentes tipos de células gustativas representan diversos estadios de una línea de diferenciación única o son independientes entre sí?.

3º) ¿De que manera actúan los factores diferenciadores neurales sobre los botones gustativos y sobre que tipos celulares estos factores son efectivos?.

Para resolver estas incógnitas hemos centrado este trabajo en un solo tipo de papila gustativa, la circunvalada central de la rata, porque esta estructura presenta una posición estable y accesible y tiene el tamaño suficiente como para poder ser fácilmente extirpada, injertada en otros sitios o bien inyectada con fármacos activos sobre la diferenciación celular.

Nuestro estudio consta de dos aproximaciones metodológicas:

1) El estudio ontogenético de los botones de la papila circunvalada central de la rata, fue realizado mediante procedimientos histológicos e histoquímicos en las papilas de animales prenatales, recién nacidos, inmaduros y adultos.

2) El análisis experimental de tres tipos de modificaciones de las condiciones normales:

a) Extirpación quirúrgica de la papila, para estudiar su posible regeneración y, en caso afirmativo, la manera en que se realiza la regeneración de los botones gustativos.

b) Transplante de la papila a una zona próxima de la superficie lingual, con el objeto de investigar si la papila injertada es viable y el efecto que la nueva locali-

zación pudiera tener sobre los botones gustativos contenidos en su epitelio.

c) Inyección local de una droga que detenga el transporte axoplásmico (colchicina) con el fin de determinar los cambios que se produzcan en las estructuras neurodependientes y relacionar estos cambios con el estado trófico de las fibras y terminaciones nerviosas afectadas.

Una aproximación experimental al estudio de la diferenciación de los botones gustativos, como el que acabamos de resumir, no ha sido realizado hasta el momento. Por otra parte, la mayoría de las conclusiones experimentales existentes en la literatura sobre este sistema de diferenciación, provienen de observaciones realizadas con microscopía óptica convencional y de la aplicación de dos técnicas histoquímicas efectivas para la coloración de las fibras nerviosas papilares y los botones gustativos (AChE y ATPasa). Estos métodos fueron también aplicados en nuestro estudio, pero se realizaron también técnicas de microscopía óptica de alta resolución, así como técnicas de microscopía electrónica, con lo que fue posible obtener un caudal de información suficientemente amplio como para responder parcial o totalmente, a las tres incógnitas fundamentales que motivaron este trabajo.

Capítulo 4. MATERIAL Y METODOS

4.1.- DESARROLLO GENERAL DE LA PAPILA CIRCUNVALADA CENTRAL

El animal utilizado para estos experimentos ha sido la rata blanca de la cepa Wistar. Con el objeto de estudiar el desarrollo ontogenético normal de la papila circunvalada central, se han empleado animales de distintas edades, desde periodos fetales hasta adultos.

1) Animales en edad fetal.

Los animales más jóvenes que se han tomado en consideración, son los fetos de 19 días. Las ratas fueron apareadas en el momento del estro y la inseminación fue determinada mediante el análisis de la presencia de espermatozoides en el exudado vaginal. Los fetos fueron obtenidos quirúrgicamente, e inmediatamente decapitados, a los 19 días de la inseminación. Las lenguas fueron disecadas lo más rápidamente posible e incluidas en distintos medios de acuerdo a las diversas técnicas. Estas técnicas utilizadas fueron las siguientes:

a) microscopía óptica: tinción con hematoxilina-eosina en cortes de parafina (animal F-1) y tinción con toluidina-bórax en cortes de Epón (animales F-2 y F-51).

b) histoquímica: tinción para AChE en cortes de criostatato (animal F-140).

c) microscopía electrónica: en material incluido en Epón y coloreado con acetato de uranilo-metanol y citrato de plomo (animales F-2 y F-51).

2) Animales recién nacidos.

Se han tomado 6 animales en el momento del nacimiento, sin cumplir un día de vida y sin que hayan mamado. Se les

ha sacrificado también por decapitación y disecado la lengua. Con estos animales se han seguido los mismos métodos de análisis que con los anteriores. Los animales designados con la nomenclatura RN-19, RN-236 y RN-237, fueron incluídos para tinción con hematoxilina-eosina en cortes de parafina; los animales RN-20 y RN-30 fueron asignados para tinción con toluidina-bórax en cortes de Epón y para microscopía electrónica, y el animal RN-27 se utilizó para la técnica histoquímica de AChE.

3) Animales de primera semana de vida postnatal.

Hemos elegido 15 animales del cuarto día de vida postnatal que fueron decapitados, extirpada la lengua e incluída para tres tipos de técnicas:

a) microscopía óptica: de la que se hicieron preparaciones teñidas con hematoxilina-eosina (animales RN-1 y RN-10) y preparaciones teñidas con toluidina-bórax (animales RN-94, RN-167, RN-168, RN-172, RN-173, RN-245, RN-255).

b) histoquímica: se hicieron técnicas de AChE (animales RN-2, RN-12, RN-115, RN-133) y ATPasa Na^+ y Mg^{++} dependientes (animales RN-66, RN-170).

c) microscopía electrónica: (animales RN-168, RN-173, RN-245, RN-255).

4) Animales de segunda semana de vida postnatal.

Diez animales de segunda semana de vida, fueron sacrificados el día 11; se les aplicaron los mismos procedimientos que a los animales de primera semana. Un animal, RN-41, fue incluído para tinción con hematoxilina-eosina; los animales RN-14, RN-6 y RN-17, se utilizaron para tinción con toluini

dina-bórax, así como para microscopía electrónica; la técnica histoquímica de AChE fue aplicada a los animales RN-3 y RN-15 y la de ATPasa, a los animales RN-92, RN-136, RN-194 y RN-153.

5) Animales de tercera semana de vida postnatal.

Se eligieron 7 animales, los cuales se sacrificaron el día 18 de vida extrauterina de la misma manera que indicamos en los animales anteriores. Los animales RN-7 y RN-16 fueron incluidos para tinción con hematoxilina-eosina; solo un animal, RN-18, se empleó para la técnica de tinción con toluidina-bórax en cortes de Epón, así como para microscopía electrónica; las técnicas histoquímicas se aplicaron a los animales RN-8, RN-18 y RN-65 (AChE) y RN-64 (ATPasa).

6) Animales adultos.

Para el estudio de los animales adultos, se han escogido 11 individuos de tres meses de edad y aproximadamente 200 gr. de peso. Fueron sacrificados con éter y sus lenguas fueron estudiadas con las mismas técnicas que hemos mencionado anteriormente de la siguiente manera:

a) los animales A-123, A-126, A-198, A-199 y A-240, fueron incluidos para tinción con toluidina bórax en cortes de Epón.

b) los animales A-100, A-251, A-252 y A-253, se examinaron con microscopía electrónica.

c) se utilizaron dos animales para las técnicas histoquímicas: A-155 para AChE y A-101 para ATPasa.

4.2.- DIFERENCIACION DE LOS BOTONES GUSTATIVOS.

La diferenciación de los botones gustativos ha sido observada en los mismos animales y con las mismas preparaciones que utilizamos en la sección 4.1.

4.3.- NEOFORMACION PAPILAR Y REGENERACION DE LOS BOTONES GUSTATIVOS.

En los animales utilizados para este experimento, hemos procedido a extirpar quirúrgicamente la papila circunvalada central. La anestesia que se empleó fue nembutal al 0.5% en alcohol del 10% (inyección intraperitoneal) o éter. Los animales fueron colocados en posición vertical, lo que se consiguió manteniéndolos en una caja, con un agujero en la parte superior, por el que asomaba exclusivamente la cabeza. Se les abría la boca mediante 4 garfios acoplados a elásticos y se traccionaba fuertemente la lengua mediante un gancho, hasta que se ponía a la vista la papila circunvalada central. Se hacía una incisión con un punzón inmediatamente por delante de la papila y a continuación se cortaba ésta con una tijera pequeña.

En algunos animales fue extirpada la papila completa y los correspondientes surcos (depapilación total); en otros se extirpó solamente la meseta papilar (depapilación parcial). Se trataron de esta manera 9 animales que fueron sacrificados con éter a los 3 (animales AD-244, AD-245, AD-248), 5 (animal AD-75), 6 (animal AD-77), 13 (animal AD-54), 16 (animal AD-60), 23 (animal AD-126) y 45 (ani-

mal AD-72) días después de la operación. Después de disecar las lenguas, las papilas fueron incluidas para histoquímica (AChE y ATPasa).

4.4.- AUTOINJERTOS PEDICULADOS DE LA PAPILA.

Con un grupo de 6 animales (AC-163, AC-158, AC-156, AC-91, AC-183, AC-235) hemos realizado el experimento de injertar la papila a uno de los lados de la lengua. Estos animales fueron anestesiados por medio de nembutal 0.5% en alcohol del 10%, inyectado intraperitonealmente; solo en un caso hemos utilizado éter como anestésico. Con el mismo método que mencionamos en los experimentos anteriores, hemos dejado a la vista la papila circunvalada, bajo lupa. Una vez localizada la papila, extirpamos un islote del epitelio dorsal de la lengua, lateral a la papila pero a su mismo nivel. A continuación, se practicó una incisión alredor de la papila abarcando más de la mitad de su circunferencia, y se cortó bien profundamente la papila por esta incisión, con lo cual, la papila queda suelta pero unida a la superficie dorsal de la lengua mediante un pedículo posterior. Con unas pinzas, se desplazó la papila hasta el lugar donde se había extirpado el islote epitelial y se fijó a los bordes de la herida por medio de uno o dos puntos practicados con un cabello hilvanado en una aguja de córnea. Se observaron las máximas condiciones de esterilidad y los animales se mantuvieron sin comer hasta dos días después de la operación. Los animales así tratados fueron sacrificados con éter, 14, 15, 30, 40 y 60 días

después de la operación y sus lenguas fueron estudiadas con microscopía óptica en cortes de Epón teñidos con toluidina-bórax.

4.5.- EFFECTO DE LA COLCHICINA SOBRE LA DIFERENCIACION DE LOS BOTONES GUSTATIVOS.

Al igual que en los experimentos de depapilación y de autoinjertos, los animales fueron colocados en posición vertical, bajo lupa, y las lenguas traccionadas.

Del grupo de 21 animales incluidos en este experimento, 5 fueron utilizados como controles (animales ACol.-113; ACol.-125; ACol.-179, ACol.-195, ACol.-171), en los cuales se realizaron una o dos inyecciones con el mismo volumen (suero fisiológico) utilizado en las inyecciones de los animales experimentales.

El grupo de 16 animales experimentales fue anestesiado con nembutal o éter e inyectado con colchicina 10 mM:

a) 15 de estos animales fueron inyectados localmente bajo la superficie libre de la papila, bajo el surco circunvalar o por debajo del epitelio inmediatamente anterior a la papila, mediante una aguja de vidrio acoplada a una jeringa accionada por un micromanipulador. A la colchicina se le añadió azul de metileno para comprobar la difusión de la inyección. La cantidad inyectada fue de unos 15 microlitros.

- cinco de estos 15 animales recibieron una sola inyección local de colchicina y fueron sacrificados 6 (animal ACol.-80), 10 (animal ACol.-87), 11 (animal ACol.-56),

y 12 (animales ACol.-42 y ACol.-81) días después. Todas estas lenguas fueron estudiadas mediante histoquímica (AChE y ATPasa).

-- diez animales recibieron dos inyecciones locales de colchicina con un intervalo constante de cinco días pero fueron sacrificados 2 (animales ACol.-215 y ACol.-221), 4 (animal ACol.-214), 5 (animales ACol.-204, ACol.-228, ACol.-210, ACol.-213, ACol.-214, ACol.-238, ACol.-239) y 15 (animal ACol.-250) días después de la segunda inyección. Tres de estos animales fueron destinados a histoquímica y los siete restantes fueron estudiados con microscopía óptica (tinción toluidina-bórax) y microscopía electrónica.

b) por último, un solo animal de los 16 (animal ACol.-205), recibió dos inyecciones de colchicina en la papila alternadas con otras dos intraperitoneales (1 mgr. de colchicina por kilo de peso del animal). Las inyecciones se realizaron a intervalos de dos días cada una, el animal fue sacrificado dos días después de la cuarta inyección y su lengua incluida para las técnicas histoquímicas de AChE y ATPasa.

4.6.- TECNICAS GENERALES.

I. Microscopía óptica.

Las lenguas de los animales seleccionados para microscopía óptica, han sido incluidas en parafina y en Epón 812 (Luft, 1961).

a) Inclusión en parafina: después de disecar las lenguas y lavarlas en ClNa al 0.9%, fueron sumergidas en el

fixador de Bouin donde se mantuvieron 2 ó 3 días. A continuación se procedió a deshidratarlas en etanol de gradaciones crecientes, fueron pasadas luego por benzoato de metilo y benceno, y por último incluidas en parafina. Una vez hecho el bloque, se cortó a 12 micras y se montaron los cortes en los portaobjetos. Las preparaciones así obtenidas fueron deshidratadas, lavadas, teñidas con hematoxilina de Harris y eosina, deshidratadas y montadas con DPX.

b) Inclusión en Epón: este material fué fijado en Karnowsky (1965) durante tres horas, lavado en Buffer cacodilato 0.2 M, pH 7.4 (una hora) y postfijado en tetróxido de osmio al 1% en Buffer cacodilato con un 5% de ClCa (dos horas). Todos estos pasos se hicieron en nevera a 4°C. A temperatura ambiente se deshidrató el material con etanol y acetona y a continuación fue incluido en Epón (Luft, 1961). El bloque de Epón fue cortado en un ultramicrotomo Reichert a una micra y las secciones fueron teñidas con toluidina-bórax. A continuación fueron observadas con microscopio de luz.

II. Histoquímica.

Hemos realizado dos tipos de reacciones histoquímicas: AChE y ATPasa Na-K dependiente.

El material seleccionado para AChE y ATPasa fue fijado en 6.25% de glutaraldehído en cacodilato 0.1 M a pH 7.4, durante dos horas y lavado en Buffer Tris maleato (tres pasos de 10 minutos cada uno) a 4°C; luego fue incluido en concentraciones crecientes de glicerol (10%,

20% y 30%) durante 6 horas a 5°C bajo cero. El material fue luego congelado en criostato y seccionado.

a) el material para AChE fue seccionado a 6-8 micras, montados en portaobjetos con albúmina y lavados los cortes durante tres minutos en sacarosa al 4%. El medio de incubación fue preparado de acuerdo a El Badawi y Senk (1967). Después de 60 minutos de incubación a 37°C, las secciones fueron lavadas durante 5 minutos en sacarosa al 4%, sumergidas en formaldehído al 10% y vueltas a lavar en agua destilada. Inmediatamente, fueron teñidas con azul de toluidina, lavadas, deshidratadas y montadas con DPX.

b) el material para ATPasa fue seccionado, montado e inmediatamente sumergido en un medio de incubación preparado de acuerdo a Koenig y Vial (1969) durante 20 minutos a 37°C. Las secciones fueron lavadas después en agua destilada y sumergidas en sulfato amónico al 3%. Se lavaron de nuevo en agua corriente durante un mínimo de 30 minutos y luego en agua destilada. A continuación, los cortes fueron deshidratados sin contraindicación alguna y montados con DPX.

III. Microscopía electrónica.

Con el material seleccionado para ser observado ultraestructuralmente, se han seguido los mismos métodos de fijación e inclusión que mencionamos en el apartado I.b). El bloque de Epón fue cortado en un ultramicrotomo Reichert a 600-800 Å; las secciones fueron teñidas con acetato de uranilo y citrato de plomo (Venable y Coggeshall, 1965) y fueron observadas con un microscopio electrónico, modelo Philips 301.

Capítulo 5. HALLAZGOS

5.1 .- DESARROLLO GENERAL DE LA PAPILA CIRCUNVALADA CENTRAL.

Periodo embrionario

El desarrollo de la papila circunvalada central es un proceso fundamentalmente postnatal. El embrión de rata de 19 días, es decir, solamente tres días antes del nacimiento, no presenta aún una papila definida. En su lugar existe una pequeña prominencia conjuntivo-epitelial apenas visible. Este esbozo papilar está recubierto por un epitelio biestratificado idéntico al del resto de la superficie dorsal de la lengua (Fig. 5.1-1).

Animal recién nacido

La rata del primer día de vida extrauterina presenta ya una papila del tipo circunvalado situada en la línea media de la lengua, por detrás del triángulo lingual. Macroscópicamente aparece como una pequeña prominencia redondeada, de aproximadamente 1 mm. de diámetro, en la superficie lingual dorsal, rodeada por un anillo, también prominente, que delimita una depresión anular o surco circunvalar, apenas visible.

Preparaciones histológicas

1) Los cortes sagitales de la lengua de los animales recién nacidos y coloreados con hematoxilina-eosina, muestran que entre el anillo peripapilar y la papila propiamente dicha, existe una proliferación compacta del epitelio de revestimiento que se profundiza considerablemente en

el tejido conectivo subepitelial (Fig. 5.1-2). Este repliegue epitelial, más profundo en la parte posterior de la papila que en la anterior, representa el esbozo del futuro surco circunvalar. En su extremo interno desembocan conductos glandulares que se distinguen del resto del epitelio por la forma de sus células y sus características tintoriales (Figs. 5.1-2 y 3).

El epitelio de cubierta papilar presenta solamente dos o tres capas de células. Las células de las capas superficiales son poliédricas y de mayor tamaño que las de la capa profunda. Estas últimas son alargadas, mantienen entre sí un contacto muy estrecho y presentan un núcleo voluminoso, de forma oval, con pequeños grumos de heterocromatina periférica y dos o tres nucleolos prominentes (Fig. 5.1-3).

Los repliegues epiteliales laterales son masas celulares compactas constituidas por elementos similares a los del epitelio de cubierta pero alineados en cuatro a seis capas. El tejido conectivo del eje papilar se extiende por debajo hasta el plano muscular. Está formado por células mesenquimáticas voluminosas e irregulares, con núcleo prominente y citoplasma de color claro (Figs. 5.1-2 y 3). Estas células forman conjuntos, separados entre sí por espacios intercelulares amplios, que incluyen perfiles de vasos sanguíneos y nervios.

2) Las preparaciones incluidas en Epón, cortadas a una micra de espesor y teñidas con azul de toluidina-bórax, muestran una papila central con características similares

a las descritas anteriormente pero permiten observar algunos detalles adicionales que pasaron desapercibidos en el material incluido en parafina y coloreado con hematoxilina-eosina.

En cortes finos de Epón las invaginaciones epiteliales laterales de la papila presentan una luz bien delimitada en su porción más profunda, pero los epitelios de las futuras superficies laterales y de las paredes del surco aparecen fusionados hacia la superficie lingual (Fig. 5.1-4). El epitelio general es claramente identificado por su estructura y coloración, presentando características similares a las anteriormente descritas. A nivel de la superficie de la invaginación epitelial que dará origen al surco papilar, se observa un mosaico compacto de células poliédricas con núcleo central (Fig. 5.1-4). En algunas preparaciones se aprecia la desembocadura de conductos glandulares en la zona profunda de la invaginación epitelial (Fig. 5.1-4).

En resumen, en el primer día de vida extrauterina, la papila central de la lengua de rata se encuentra todavía en desarrollo y su componente epitelial no presenta evidencias microscópicas de diferenciaciones específicas.

Preparaciones histoquímicas

1) AchE: las preparaciones de lenguas de rata del primer día de vida postnatal, en cortes frontales de ocho micras realizados en criostato y tratados con la técnica histoquímica para AchE, fueron contrateñidas con azul de toluidina, por lo que, tanto la papila central como sus estruc-

turas asociadas, presentan características similares a las de las preparaciones que hemos descrito anteriormente.

La reacción de la AChE se ha manifestado positivamente y con mucha intensidad en la región del conectivo que rodea a la superficie basal de las invaginaciones epiteliales que delimitan a la papila. En estos lugares se observa un verdadero plexo de fibras nerviosas AChE positivas y de pequeño diámetro (Figs. 5.1-5 y 6), en conexión con ramas nerviosas más gruesas del eje papilar, las que a su vez se continúan con nervios relativamente voluminosos en el conectivo subpapilar.

La reacción fue siempre negativa en el interior del epitelio por lo que es posible sostener que, en este momento del desarrollo, no existen todavía fibras AChE positivas intraepiteliales. En el conjuntivo de la parte superior de la papila se observaron escasas fibras que se ramifican por debajo del epitelio de cubierta. La reacción permite estudiar en detalle la distribución de las fibras nerviosas que inervan la papila.

La Fig. 5.1-6 permite ver muy claramente una rama nerviosa gruesa perpendicular al eje de la papila sobre la parte derecha del surco, que luego penetra en el conectivo papilar y da una serie de ramas hacia el epitelio. Alrededor del surco y en las paredes laterales, las fibras nerviosas forman una red en continuidad aparente con el componente nervioso del conectivo del eje papilar.

En conclusión, aún cuando la papila del animal recién nacido no muestra diferenciaciones epiteliales del tipo

gustativo, su inervación está ya bien desarrollada y presenta una sistematización definida en relación con las zonas del epitelio en las que se diferenciarán, más adelante, los corpúsculos gustativos.

Animal de primera semana de vida postnatal

A los cuatro días de vida postnatal, la papila central de la rata es de mayor tamaño que en el animal recién nacido y el surco circunvalar aparece ya como una depresión profunda del epitelio.

Preparaciones histológicas

1). En cortes de parafina coloreados con hematoxilina-eosina, la papila ofrece forma de seta sobresaliendo del epitelio, con dos surcos laterales bien definidos y delimitados en su cara externa por un labio circular. En cortes sagitales, el surco se profundiza considerablemente en la región posterior, pero solamente está esbozado en la anterior (Figs. 5.1-7 a 9). El epitelio de cubierta ha umentado de espesor y presenta cuatro o más capas de células. A nivel de la hilera basal se observan frecuentes figuras mitóticas. En el fondo del surco los conductos de las glándulas desembocan, al parecer, en forma simétrica.

En el animal de primera semana, el epitelio lateral de la papila y el epitelio del surco, presentan importantes cambios con respecto al animal recién nacido. Las células basales aumentan su longitud pero mantienen sus características tintoriales. El límite preciso entre el epitelio y el conectivo subyacente se pierde en algunas zonas del epipi

telio papilar y del epitelio del surco debido a que las fibras nerviosas del plexo papilar penetran, durante esta semana, entre los elementos epiteliales. En los sitios de penetración las fibras nerviosas ingresan al epitelio, al parecer, acompañadas de sus células de Schwann (Figs. 5.1-8 a 10). Estas células tienen aspecto fusiforme, citoplasma basófilo y su eje mayor es aproximadamente perpendicular a la superficie del epitelio. En las preparaciones teñidas con hematoxilina-eosina, las fibras nerviosas gustativas del plexo papilar, son evidenciables por sus células satélites (Fig. 5.1-11). En los sitios de penetración del nervio se observan además abundantes figuras mitóticas que aparecen rodeadas por células de Schwann (Figs. 5.1-9 y 10). Estas figuras están localizadas tanto en el interior del epitelio como en el conectivo subyacente (Fig. 5.1-9). En las mitosis intraepiteliales resulta difícil determinar el tipo de células que se están dividiendo; las imágenes son similares a las observadas en el conectivo y aparecen tanto en las capas de células epiteliales basales como en las células de la segunda o de la cuarta capa. Esto no se observa en el resto del epitelio lingual que solo presenta figuras mitóticas a nivel de la capa basal y donde estas figuras son mucho más escasas.

En el animal de primera semana no se observan todavía botones gustativos típicos (para más detalles ver sección 5.2). La Fig. 5.1-8 representa al futuro epitelio gustativo y muestra claramente la penetración de células fusiformes acompañando a las fibras nerviosas que llegan desde

el conectivo subepitelial. Las Figs. 5.1-9 y 10 muestran a mayor aumento las diferencias estructurales entre las células basales del epitelio y las células fusiformes. Muestra también la íntima relación topográfica que las células fusiformes establecen con las figuras mitóticas intraepiteliales.

2) Las preparaciones de lengua de primera semana incluídas en Epón mostraron la existencia de algunas especializaciones a nivel del epitelio de la pared del surco, de la pared papilar y de la superficie papilar. Estas especializaciones recuerdan a los botones gustativos que se definirán claramente en la siguiente semana (Figs 5.1-12 a 15). Tienen forma esférica u oval, con una región basal en continuidad con el tejido conectivo y una región apical que, en la mayoría de los casos, no llega hasta la superficie libre del epitelio. Están representadas por un conjunto de células orientadas perpendicularmente a la superficie. La mayoría de estas células son fusiformes, tienen escaso citoplasma y mayor afinidad tintorial que el resto de las células epiteliales. Su aspecto es similar al de las células fusiformes que acompañan a los tractos nerviosos del conectivo subepitelial. Entre estas células fusiformes pueden aparecer una o dos células, también fusiformes, pero más voluminosas y de citoplasma más pálido que el de las células normales del epitelio.

La Fig. 5.1-15 ilustra uno de estos botones gustativos primitivos en corte aproximadamente transversal y permite determinar que las células fusiformes oscuras se agruu

pan en forma de laminillas concéntricas.

Preparaciones histoquímicas
.....

1) AChE: las preparaciones teñidas para AChE y contra teñidas con azul de toluidina, muestran en la superficie papilar un epitelio similar al descrito con técnicas his tológicas.

En el epitelio de las paredes del surco y en el de las superficies laterales de la papila, aparecen algunos espacios claros, de forma redondeada u ovalada, la mayoría de tamaño pequeño y bien delimitados. Aún cuando no se ob servan todavía botones gustativos típicos, estas formaciones sugieren la presencia de formaciones epiteliales muy sen sibles al procesamiento utilizado en la obtención de las preparaciones y corresponderían a los botones primitivos que aparecen en el material incluido en Epón.

La reacción histoquímica evidencia que la distribución de las fibras nerviosas que inervan el epitelio, ofrece escasas modificaciones con respecto al animal recién nacido (Fig. 5.1-16).

2) ATPasa: la reacción histoquímica de la ATPasa para estos mismos animales resultó positiva sobre las fibras nerviosas que inervan el epitelio del surco y la superfi cie papilar lateral, es decir, sobre componentes que son también teñidos con la técnica para AChE. Estas observacione s comparativas demuestran que los tractos nerviosos iner vantes poseen ambas actividades enzimáticas (Fig. 5.1-17). En el conectivo axial de la papila pueden observarse ade más vasos sanguíneos ATPasa positivos que se dirigen, lon

gitudinalmente, desde la base al apex papilar. Por otra parte, el epitelio papilar en cualquiera de sus porciones y el epitelio de cubierta lingual, reaccionan negativamente ante la tinción para ATPasas totales. Los botones primitivos dan, en general, reacción negativa pero, en algunos, se observa una reacción positiva axial. Al parecer, son las fibras intracorporculares los elementos teñidos.

Animal de segunda semana de vida postnatal

Preparaciones histológicas.

1) Las lenguas de rata de segunda semana de vida postnatal, muestran que la papila circunvalada central sobresale ya en la superficie y los surcos laterales son más profundos que en la primera semana.

El epitelio papilar de cubierta es más grueso pero no presenta espesor uniforme. En algunos lugares y sobre todo en las superficies laterales y paredes del surco, se pueden contar de siete a diez capas de células epiteliales.

En el epitelio gustativo de la superficie lateral de la papila y de las paredes del surco, las células basales son de forma columnar y mantienen entre sí contactos íntimos. En este epitelio aparecen ya muy diferenciados los botones gustativos. En total se observan aproximadamente 22 botones por corte sagital; éstos presentan un tamaño irregular y tienen forma redondeada u ovoidea. En cortes paralelos al epitelio, los botones aparecen distribuidos en filas (Figs. 5.1-18 a 20), y en su interior se aprecian numerosas células oscuras del tipo filiforme y orientación

paralela al eje del botón. Los botones pequeños presentan alrededor de nueve células fusiformes mientras que los de gran tamaño pueden contener 20 o más células. En todos los botones quedan espacios amplios ocupados por células claras (Fig. 5.1-20).

En el conjuntivo subpapilar se observan, al igual que en estadios más tempranos, acinos y conductos glandulares. Estos últimos desembocan en el surco papilar en número de 18 por papila. La papila de la Fig. 5.1-18, en corte sagital, nos muestra los seis conductos inferiores y los dos conductos superiores correspondientes a una mitad de la papila.

2) Los cortes de lengua de rata de dos semanas, correspondientes al material incluido en Epón, cortado a una micra y teñidos con toluidina-bórax, muestran que el epitelio del surco circunvalar está formado por células irregulares, con un núcleo de mediano tamaño y un nucleolo bien definido (Fig. 5.1-21). Estas células están unidas entre sí por una serie de procesos citoplasmáticos que circunscriben canales intercelulares de aspecto claro (Fig. 5.1-22). Incluidos en este epitelio aparecen los corpúsculos gustativos con forma de redoma y perfectamente delimitados por una cápsula constituida por células aplanadas que forman laminillas basófilas superpuestas (Fig. 5.1-21)

El análisis de secciones seriadas de papilas de segunda semana demostró: a) que el número total de botones en cada una de las porciones del surco, es de 20 aproximadamente y b) que estos botones presentan un tamaño variabl

El análisis estructural de los corpúsculos revela que están constituidos por tres tipos de células: a) células basófilas filiformes que aparecen teñidas intensamente teñidas por el azul de toluidina, b) células voluminosas y alargadas que presentan citoplasma claro y c) células de afinidad tintorial intermedia. En la sección 5.2 se completará la descripción del desarrollo de los botones gustativos.

Preparaciones histoquímicas

1) AChE: en las preparaciones de lengua de rata de dos semanas, teñidas con la técnica para AChE, el epitelio que bordea al surco circunvalar aparece engrosado e incluye botones gustativos. La distribución de la AChE es comparable a la obtenida en preparaciones homólogas de ratas de la primera semana. La reacción es positiva sobre las fibras nerviosas ramificadas que forman el plexo subepitelial de las superficies laterales de la papila y de las paredes del surco (Fig. 5.1-23). A diferencia de lo observado en estadíos más tempranos, pueden distinguirse ya ramificaciones AChE positivas que penetran en algunos botones llegando hasta el tercio interno u ocasionalmente, ascienden hasta las proximidades de la superficie externa del corpúsculo (fibras intracorpúsculares).

2) ATPasa: la reacción histoquímica para ATPasa se manifestó positivamente sobre el sistema de inervación. En el punto de convergencia de las raíces papilares de ambos nervios glossofaríngeos, aparece un ganglio formado por muchas neuronas pequeñas intensamente teñidas. En el eje co

nectivo papilar se observan ramas nerviosas y vasos san
guíneos positivos (Fig. 5.1-24). La reacción es también
positiva en algunos de los botones del epitelio gustatii
vo del surco y de las paredes papilares.

Animal de tercera semana de vida postnatal

Preparaciones histológicas

1) Los cortes paralelos a la superficie lingual que
ilustran las Figs. 5.1-25 a 27, corresponden a lenguas de
rata de tercera semana, incluidas en parafina. El número
de capas de células del epitelio sigue siendo el mismo
que en la segunda semana.

Las preparaciones muestran claramente la presencia de
botones incluidos en el epitelio de la papila y de las su
perficies laterales del surco. El número de botones varía
de una figura a otra dependiendo de la altura del corte.
Los botones presentan poros gustativos bien definidos
(Figs. 5.1-25 y 26). La Fig. 5.1-26 muestra 22 botones en
un corte perpendicular a la papila y cercano a su base.
Esto demuestra que los botones están distribuidos en lín
neas que se superponen desde la región profunda del surco
hacia la parte superficial.

2) Los cortes de una micra de lengua de rata de tercera
semana incluidos en Epón y teñidos con azul de toluidina,
muestran que el epitelio papilar es más grueso que en el
animal de la segunda semana debido a que las células epiti
teliales presentan un volumen mayor. Este detalle pasa de

sapercibido en las preparaciones incluidas en parafina. Los botones están delimitados por una cápsula de células aplanadas agrupadas en forma de laminillas (Fig. 5.1-28). Los botones han cambiado de forma, ya no son como redomas sino esféricos. En su interior, las células presentan un ordenamiento más preciso que en la segunda semana. En general han aumentado de tamaño pero existen todavía algunos muy pequeños. Hay mayor número en la parte que corresponde a las superficies laterales de la papila que en las paredes del surco (Fig. 5.1-28).

Preparaciones histoquímicas.....

1) AChE: en las preparaciones de lengua de rata de la tercera semana de vida, la técnica de AChE-azul de toluidina, nos muestra una papila en la forma acostumbrada y rodeada por un surco amplio (Fig 5.1-29).

El epitelio de las superficies laterales y el de las paredes del surco, está ocupado por botones que han aumentado de volumen con respecto a los de edades anteriores y dan reacción negativa (Fig. 5.1-29).

La reacción histoquímica contribuyó a revelar la existencia del ganglio nervioso del conectivo axial de la papila (Fig. 5.1-29). A este ganglio llegan fibras nerviosas gruesas aferentes perpendiculares al surco, desde las regiones laterales derecha e izquierda. Hacia arriba y paralelamente al eje de la papila, el ganglio se continua con un nervio voluminoso que se va adelgazando progresivamente hacia la parte apical donde se resuelve en una serie de fibras finas y poco numerosas que contactan con la base

del epitelio superficial, pero no penetran en él. La Fig. 5.1-29 corresponde a una sección lateral al nervio a que hacemos referencia. En íntima relación con las estructuras nerviosas del eje papilar existen abundantes células cebadas que contienen gránulos citoplasmáticos metacromáticos.

Bordeando la superficie lateral de la papila y de las paredes del surco hay un plexo de fibras nerviosas finas que se superponen paralelamente al epitelio y emiten prolongaciones perpendiculares hacia los botones gustativos (Figs. 5.1-29 y 30).

Estas fibras rodean la parte basal de los botones y penetran en los mismos para terminar como expansiones esféricas entre las células gustativas. El número de fibras es menor en el fondo mismo del surco donde desembocan los conductos glandulares anexos. También existen fibras finas rodeando los conductos y acinos glandulares.

2) ATPasa: la reacción de ATPasa para estos mismos animales se manifiesta también positivamente a nivel de las fibras nerviosas que se agrupan paralelamente al epitelio profundo de la superficie papilar y de las paredes del surco. Estas fibras penetran en los botones gustativos, cuyas células dan también una reacción intensamente positiva. Los botones gustativos son las únicas estructuras epiteliales positivas, el resto del epitelio no presenta actividad ATPásica alguna (Fig. 5.1-31).

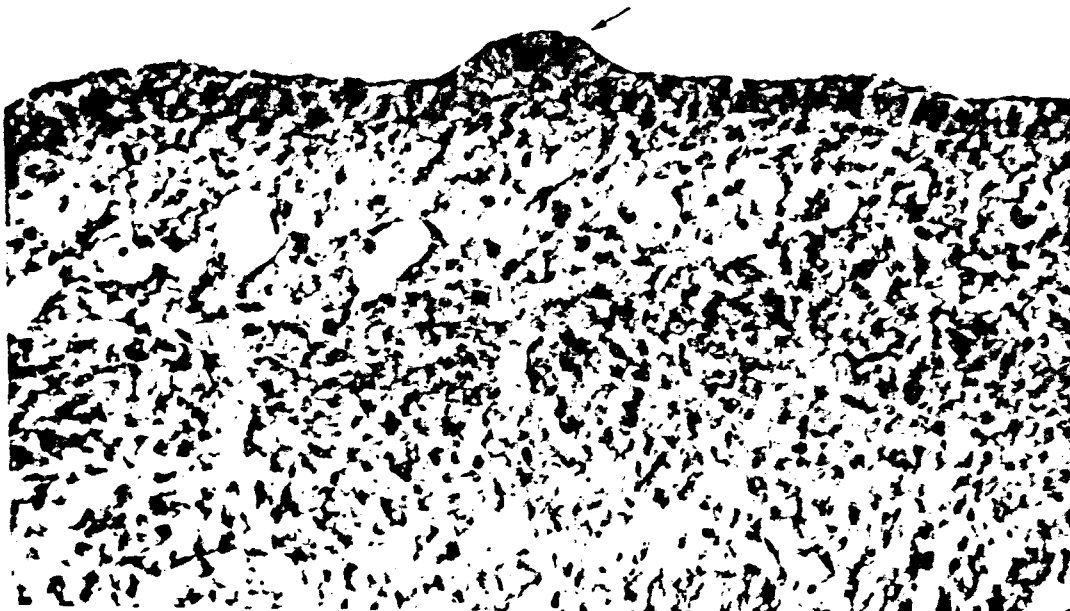


Fig. 5.1-1.- Superficie dorsal de la lengua. Embrión de 19 días. Flecha: esbozo de la papila circunvalada central. Inclusión: parafina. Coloración: H-E. 50x.



Fig. 5.1-2.- Papila circunvalada. Corte frontal. Animal recién nacido. Flechas: repliegues epiteliales. Inclusión: parafina. Coloración: H-E. 70x.



Fig. 5.1-3.- Papila de animal recién nacido. Corte frontal mostrando las características del epitelio y uno de los pliegues que se profundiza en el conectivo. Flechas: diferentes capas de células. m: mitosis. Inclusión: parafina. Coloración: H-E. 300x



Fig. 5.1-4.- Corte frontal de la papila circunvalada de un animal recién nacido mostrando un conducto glandular que desemboca en un repliegue epitelial (flecha). Inclusión: Epón. Coloración: toluidina-bórax. 70x.



Fig. 5.1-5.- Corte frontal de la papila circunvalada de un animal recién nacido que muestra el plexo nervioso alrededor de los surcos, todavía cerrados. Coloración: AChE-azul de toluidina. 70x.

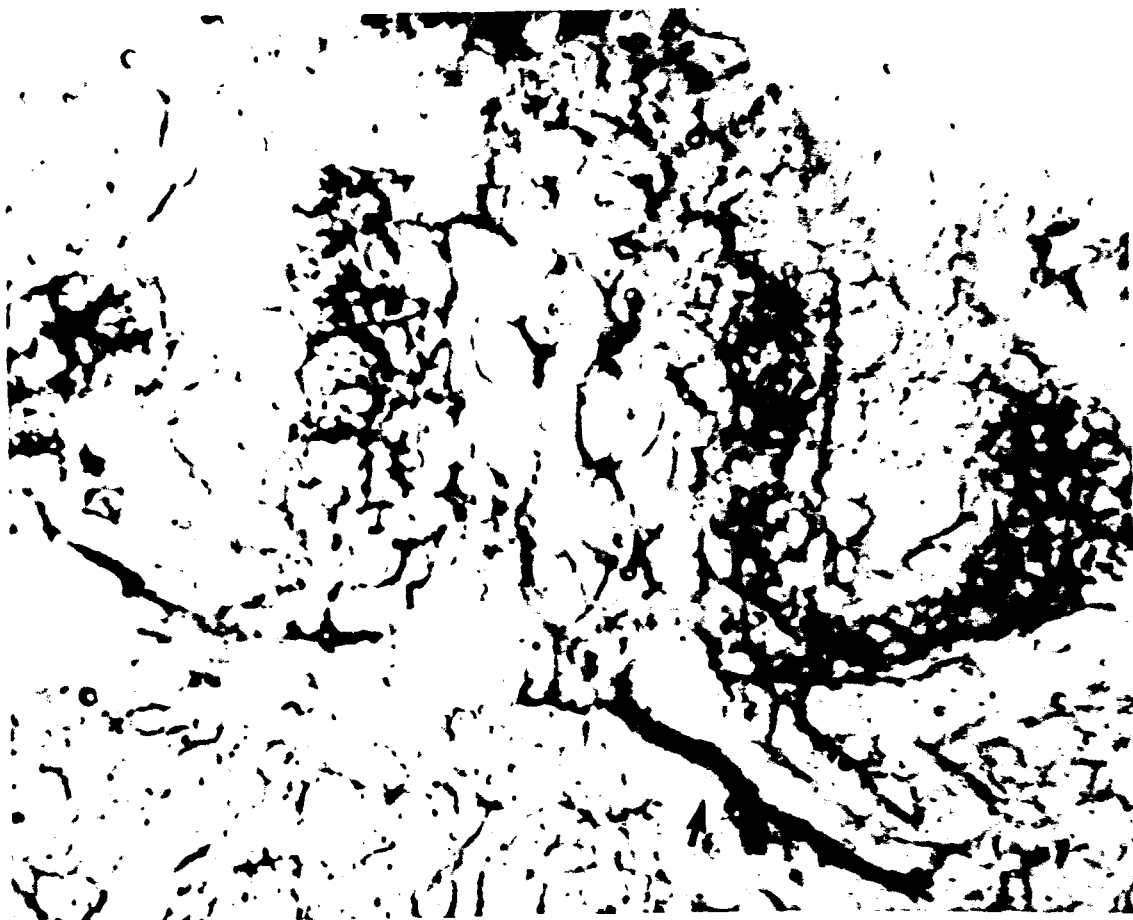


Fig. 5.1-6.- Corte frontal de la papila circunvalada de un animal recién nacido. Flecha: fibra avanzando hacia el centro de la papila. Coloración: AChE-azul de toluidina. 90x.



Fig. 5.1-7.- Corte sagital de la papila circunvalada. Animal de primera semana. Inclusión: parafina. Coloración: H-E. Flecha: límite apical del surco circunvalar en nivel posterior. 100x.

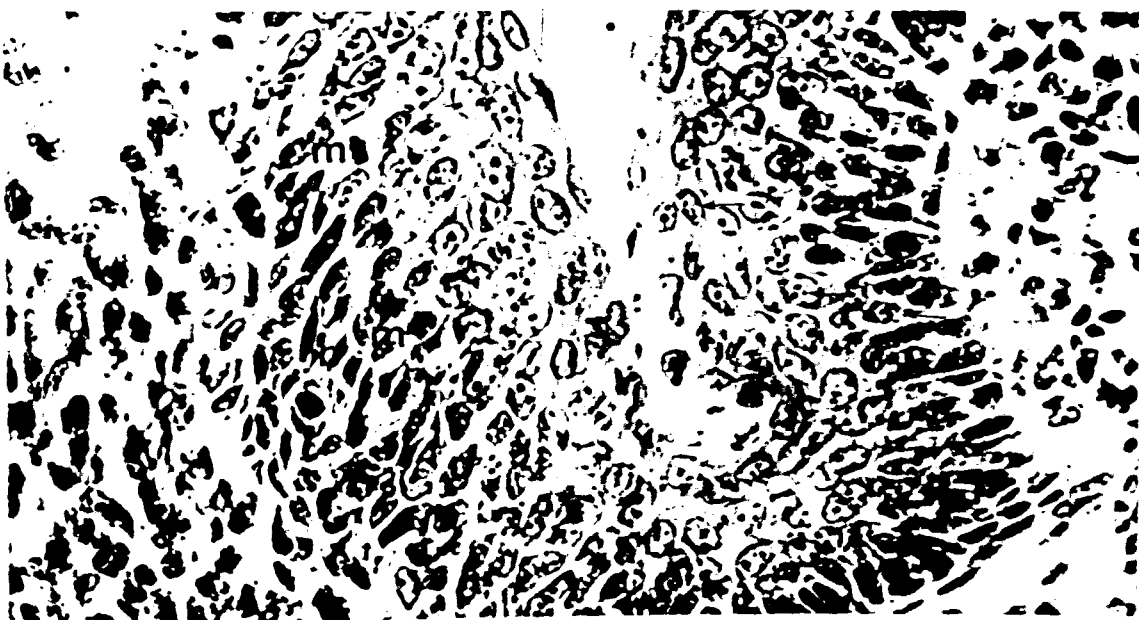
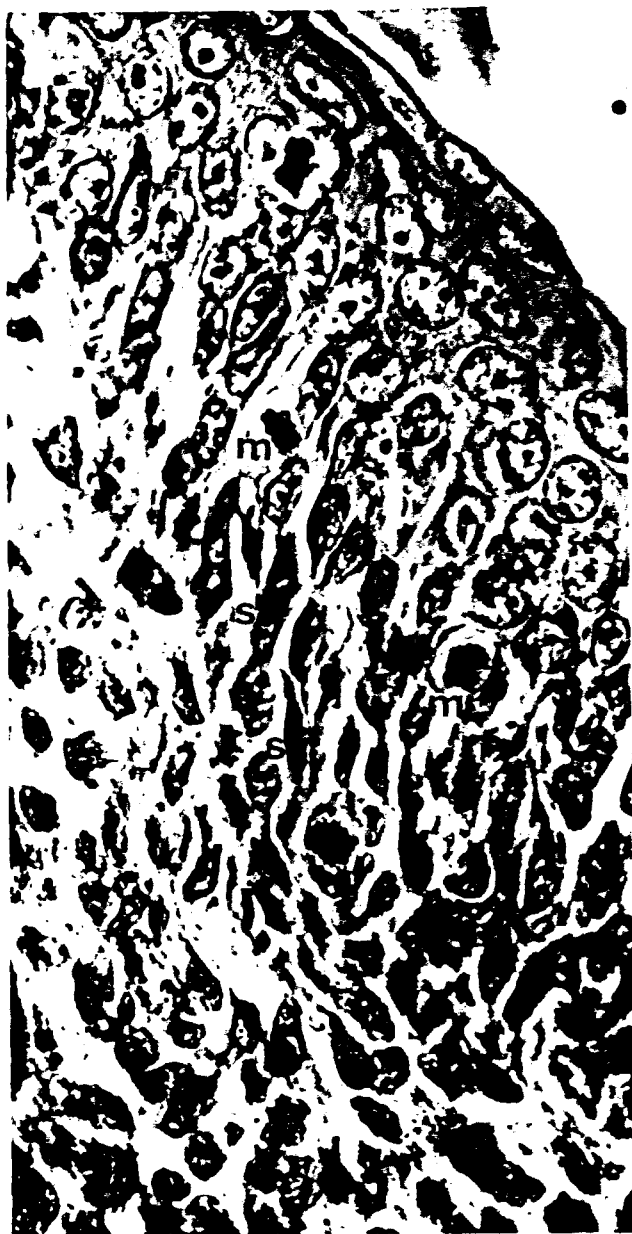


Fig. 5.1-6.- Detalle del fondo del surco circunvalar en su parte posterior. Flechas: capas celulares epiteliales. M: mitosis. B: esbozo de botón. 300x.

Fig. 5.1- 9.- Detalle
del epitelio gustati-
vo mostrando la entra-
da de células tipo
Schwann desde el co-
nectivo, rodeadas por
figuras mitóticas. Es
to es el primer esbozo
de un futuro botón. M:
mitosis. S: células ti-
po Schwann. 600x.



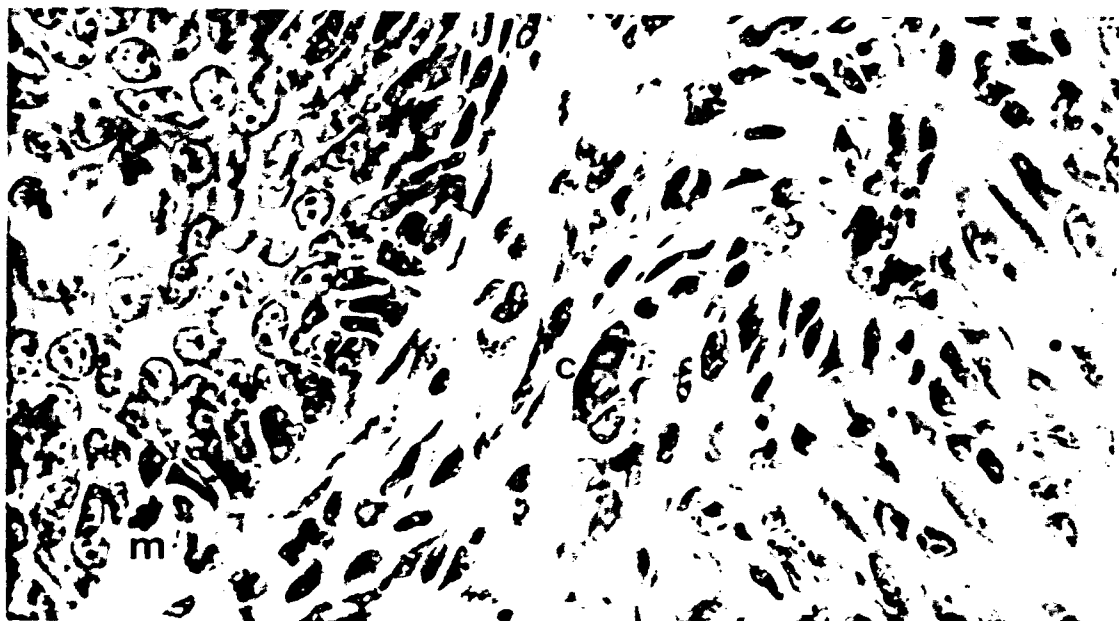


Fig. 5.1-10.- Fondo de surco y tejido conectivo de la papila central del animal de primera semana que mostramos en las figuras anteriores. m: mitosis. C: agrupación de células cromafines. Flechas: células fusiformes. 400x.

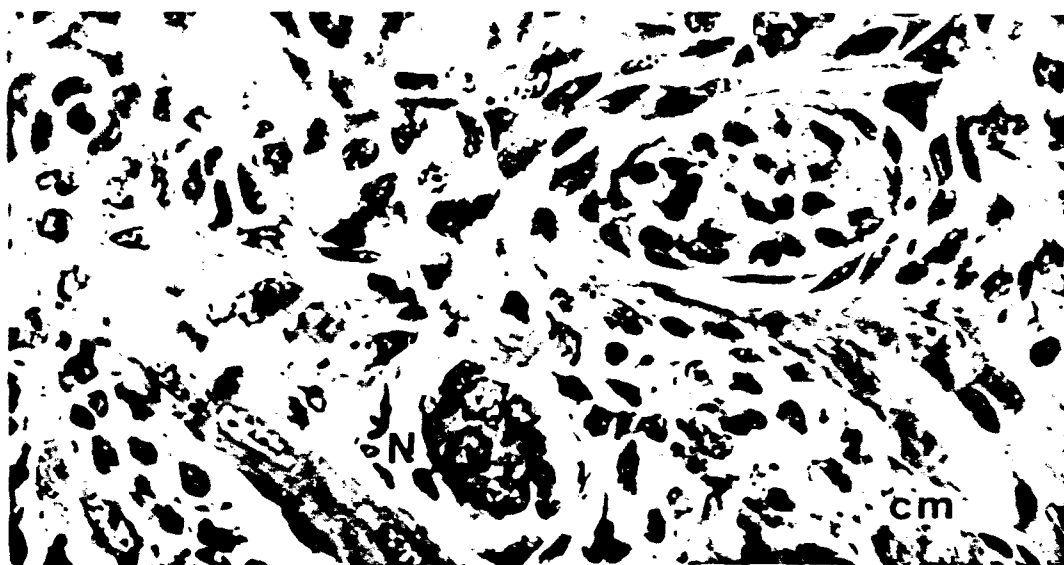


Fig. 5.1-11.- Tejido conectivo subpapilar. C. M.: células musculares. N: nervio. 400x.



Fig. 5.1-12.- Surco de la papila circunvalada de un animal de la primera semana. Inclusión: Epón. Coloración: Toluidina-bórax. B.P.: botones primitivos. 200x.

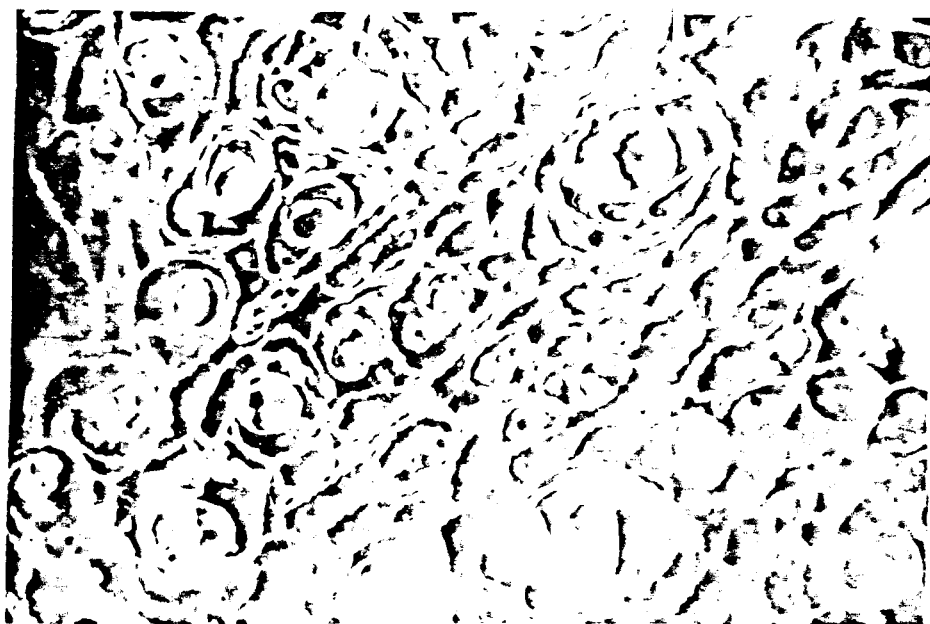


Fig. 5.1-13.- Detalle del epitelio gustativo del animal anterior para mostrar los botones primitivos. 400x.

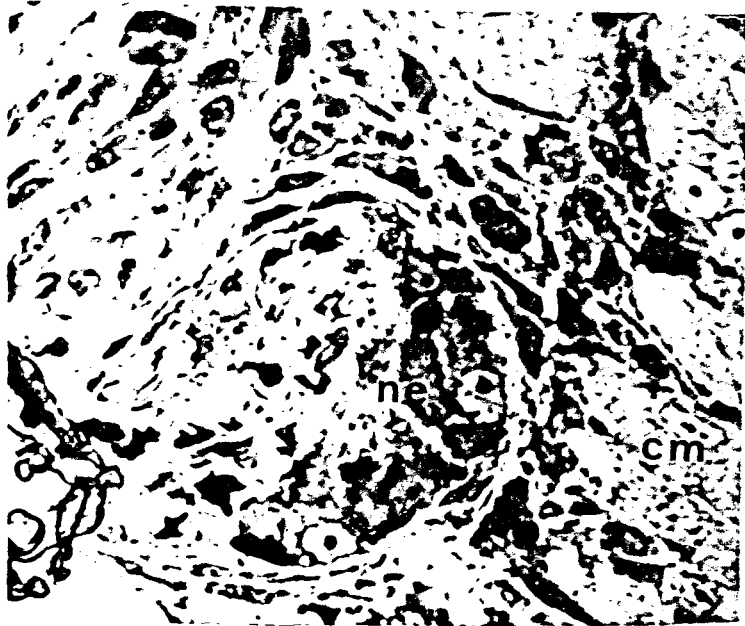


Fig. 5.1-14.- Parte basal de la papila circunvalada de un animal de la primera semana; mostrando el ganglio papilar. Inclusión: Epón. Coloración: toluidina-bórax. N.E.: neuronas. C.M.: células musculares. 400x.



Fig. 5.1-15.- Corte transversal de un botón gustativo de la primera semana. Se puede apreciar que está formado por 2 células claras, 2 intermedias y 6 oscuras, rodeadas por células capsulares aplanadas. Inclusión: Epón. Coloración toluidina-bórax. 500x.

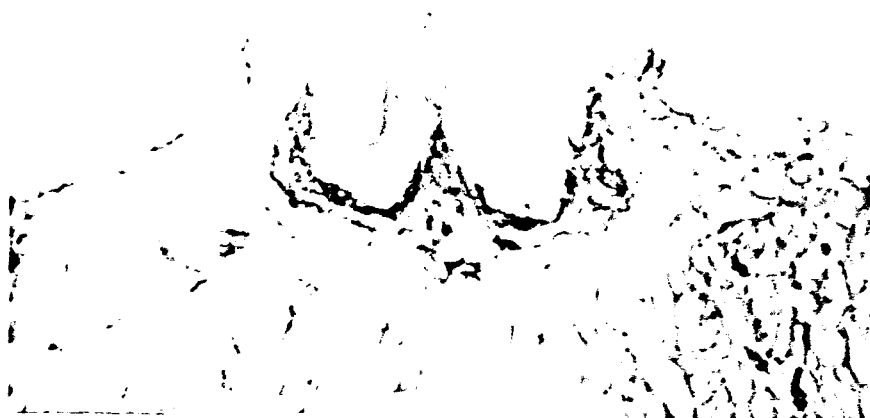


Fig. 5.1-16.- Corte transversal de la papila de un animal de la primera semana, tratado con la técnica histoquímica de AChE-azul de toluidina. Se observa la ausencia de botones en el epitelio gustativo aunque la reacción es positiva en las fibras nerviosas que rodean los surcos. 70x.



Fig. 5.1-17.- Papila circunvalada de un animal de la misma edad que el de la figura anterior, pero con técnica histoquímica de ATPasa. Los componentes teñidos por la reacción son los mismos que lo han sido con la AChE. Se tiñen además los vasos sanguíneos. 100x.

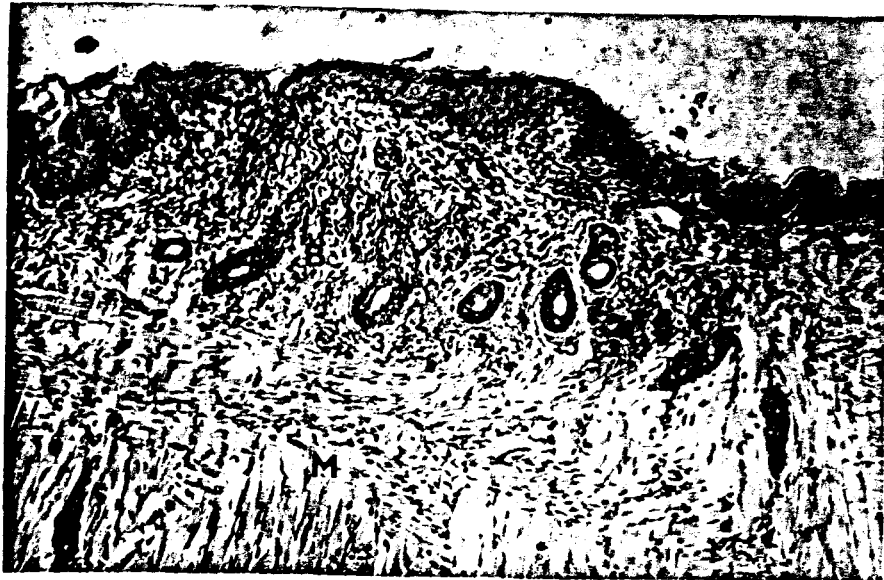


Fig. 5.1-18.- Papila en corte sagital, paralelo al surco circunvalar, en su porción lateral. Animal de segunda semana. 1 a 6: desembocaduras de conductos glandulares en la zona profunda del surco. 7 y 8: conductos glandulares desembocando a niveles más superficiales. B: botones gustativos. M: músculo. Inclusión: parafina. Coloración: H-E. 100x.



Fig. 5.1-19b.- Detalle de la figura anterior. 600x.

Fig. 5.1-19b.- Corte sagital de la papila de un animal de segunda semana mostrando botones aproximadamente oblicuos a la superficie libre. B: botones gustativos. F: células fusiformes. S: surco papilar. N: tracto nervioso. C: conectivo. E: epitelio. Inclusión: parafina. Coloración: H-E. 600x.



Fig. 5.1-20.- Ampliación de un sector de la figura 5.1-19a, mostrando perfiles de células fusiformes que penetran al epitelio desde el conectivo subyacente. 800x.

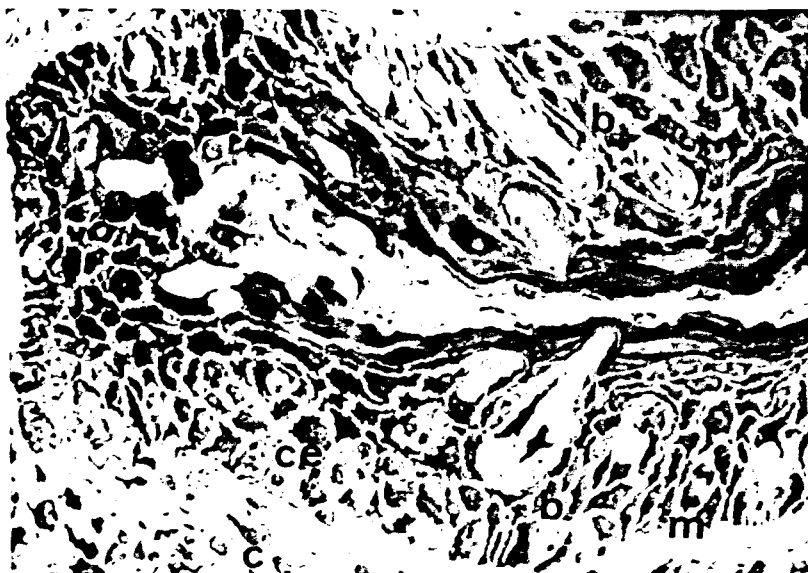


Fig. 5.1-21.- Surco papilar de un animal de segunda semana, en el que aparecen corpúsculos gustativos incluidos en el epitelio. Inclusión: Epón. Coloración: toluidina-bórax. C.e.: células epiteliales. C: conectivo. B: botones gustativos. M: mitosis. Flecha: célula tipo Schwann entrando al epitelio. 300x.



Fig. 5.1-22.- Botón gustativo de un animal de segunda semana, formado por dos células claras, tres intermedias y tres oscuras. Se observa que las prolongaciones citoplasmáticas de las células intermedias y oscuras forman el poro de desembocadura. Inclusión:Epón. Coloración: toluidina-bórax. S: surco papilar. P: poro apical. 800x.



Fig. 5.1-23.- Corte frontal de la papila de un animal de la segunda semana. Tinción: AChE-azul de toluidina. Las fibras teñidas positivamente por la reacción, rodean a los surcos y penetran en los botones. 80x.

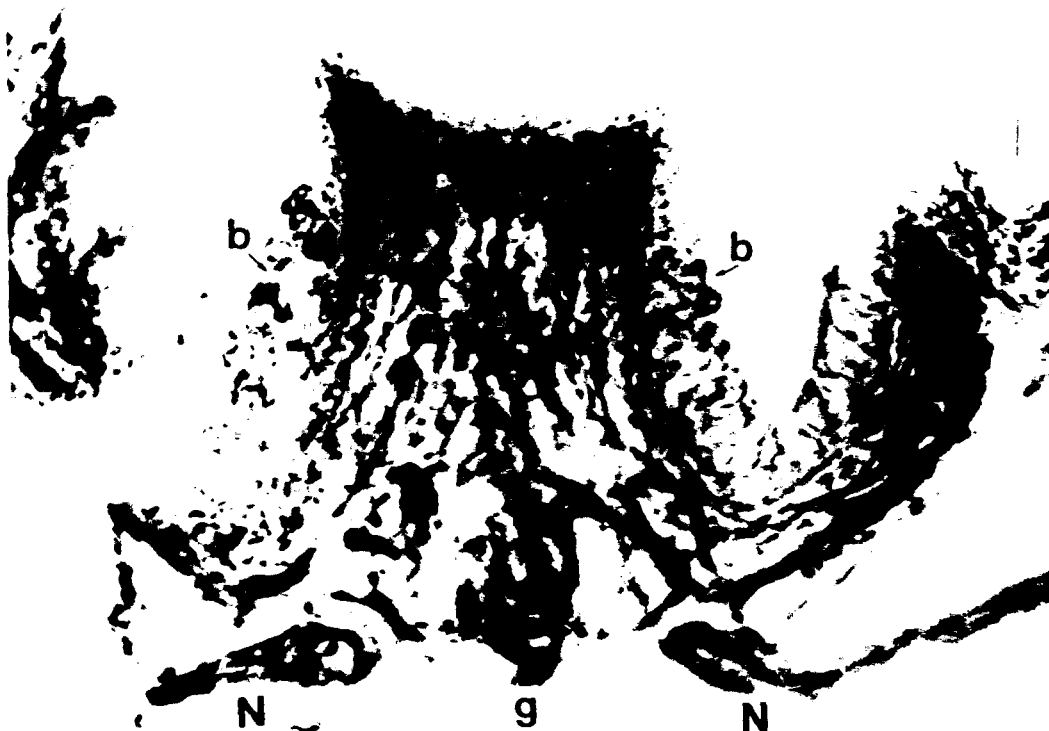


Fig. 5.1-24.- Se muestra en esta figura, la papila circunvalada correspondiente a un animal de segunda semana, teñida con la técnica histoquímica de ATPasa. G:ganglio papilar. N: ramas del glossofaríngeo. B:botones gustativos. 100x.



Fig. 5.1-25.- Corte paralelo a la superficie lingual de un animal de tercera semana. Inclusión: parafina. Coloración: H-E. S: parte posterior del súrco circunvalar. G: conductos glandulares. Flechas: botones gustativos. 70x.

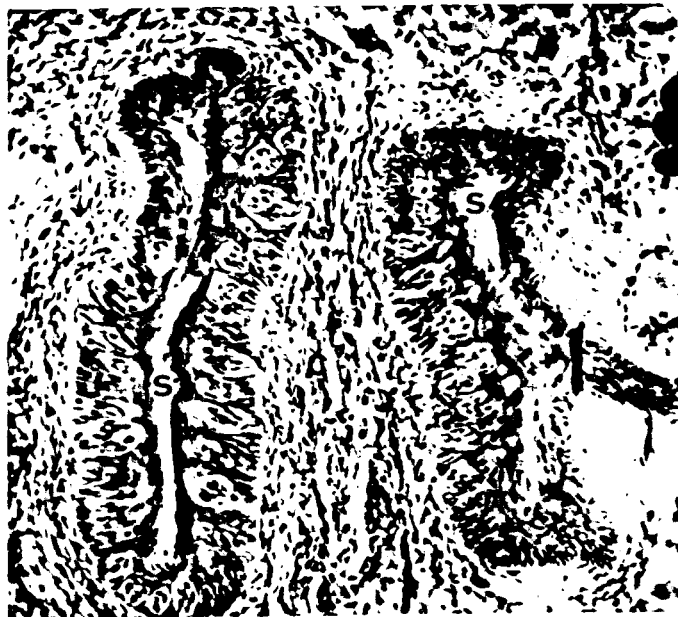


Fig. 5.1-26.- El mismo animal de la figura anterior nos muestra el mismo corte de la papila, pero en una región más profunda. El número de botones es mayor a este nivel y casi todos presentan poros apicales y basales. S: surco. C: conectivo. 150x.



Fig. 5.1-27.- La figura muestra una papila en corte sagital, a nivel lateral, de un animal de tercera semana. C: conectivo. G: acinos glandulares. Flecha: superficie del epitelio. Inclusión: parafina. Coloración: H-E. 70x.

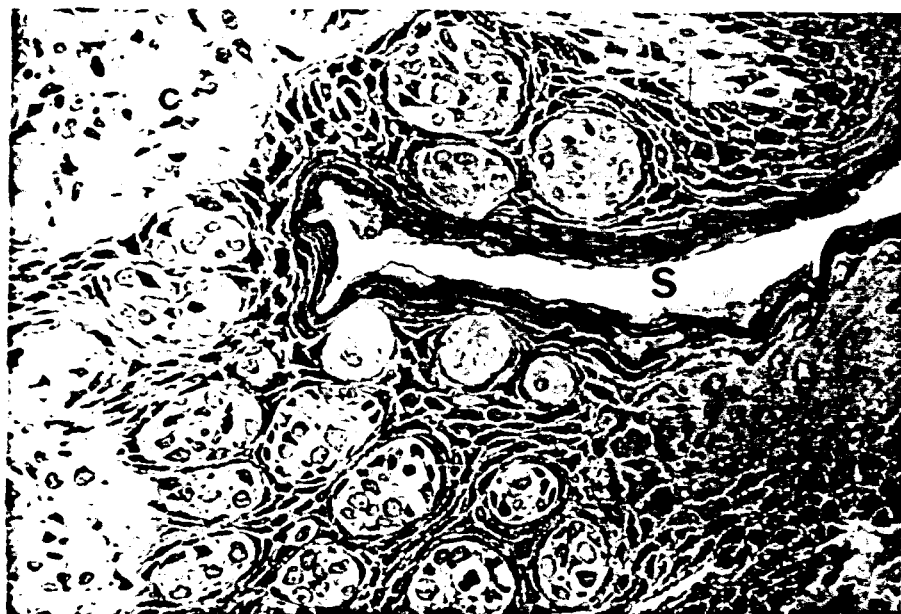


Fig. 5.1-28.- Un surco de la papila circunvalada en corte oblicuo. Animal de tercera semana. Inclusión: Epón. Coloración: toluidina-bórax. El epitelio gustativo aparece ocupado por botones típicos que presentan una gran cantidad de células oscuras e intermedias. S: surco. C: conectivo. 300x.



Fig. 5.1-29.- Papila en corte frontal, de tercera semana. Tinción: AChE-azul de toluidina. G: ganglio papilar. R: ramas nerviosas aferentes. P: plexos nerviosos papilares. Flechas: botones gustativos. 200x.



Fig. 5.1-30.- Surco de la papila en corte frontal. Tinción: AChE- azul de toluidina. Los puntos y líneas AChE positivos en el interior de los corpúsculos, corresponden a fibras y terminaciones intragemales. La mayoría se encuentra localizada en el tercio basal de los botones. 400x.

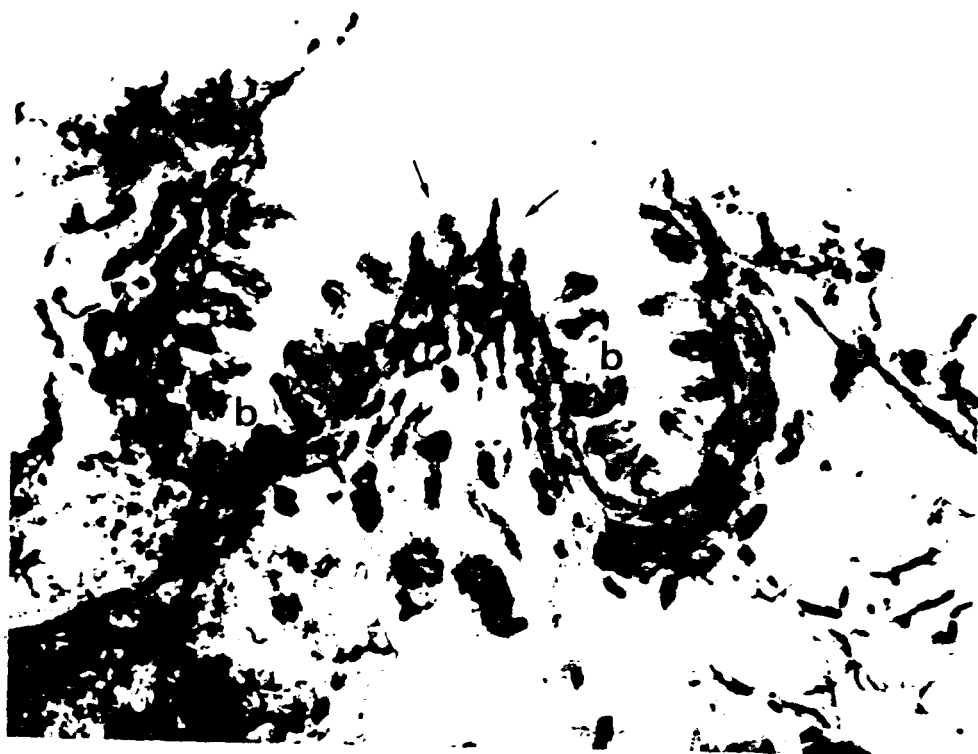


Fig. 5.1-31.- Animal de tercera semana. Tinción: ATPasa. Las fibras del plexo papilar así como los botones, responden positivamente a la reacción. B: botones. Flechas: límites del epitelio. 150x.

5.2.- DIFERENCIACION DE LOS BOTONES GUSTATIVOS.

No se observaron botones gustativos en la papila de animales recién nacidos. La diferenciación de estas estructuras se realiza durante la primera semana.

Primera semana

En cortes de parafina teñidos con hematoxilina-eosina, es difícil distinguir botones gustativos en el epitelio de la papila o en el epitelio del surco. Aparecen, sin embargo, estructuras formadas por grupos de células alargadas y en íntimo contacto, que tienen ya la forma de los futuros botones. Las preparaciones teñidas para ATPasa demuestran que estas formaciones, vinculadas con los futuros botones, carecen de actividad enzimática (Fig. 5.1-17), por lo que el epitelio gustativo en conjunto, da una reacción negativa (ver sección 5.1). Como ya hemos visto, la técnica de AChE reveló que el epitelio gustativo está innervado por un plexo nervioso bien desarrollado.

Las preparaciones que mejor muestran la estructura de los botones inmaduros son las incluídas en Epón y coloreadas con azul de toluidina. Los recuentos han permitido calcular que el número total de botones más o menos definidos llega a 22. Otras 44 formaciones sugieren botones muy inmaduros (Fig. 5.1-13). El análisis de secciones o cortes seriados del epitelio gustativo reveló que los botones inmaduros contienen células claras, intermedias y oscuras. Las medias del total de células por botón en el animal de pri

mera semana son ilustradas por la figura 5.2-1. Los porcentajes relativos de cada uno de los tipos celulares está a favor de las células oscuras.

La Fig. 5.2-2 muestra cortes seriados de estos botones inmaduros. Para mayor clarificación han sido calcados de las fotografías originales.

El estudio de las figuras mitóticas en el epitelio gustativo, en 20 cortes de parafina, cada uno de 12 a 14 micras, de los animales de primera semana, reveló un total de 143. Estas mitosis no presentan relaciones específicas con los botones gustativos en formación (Fig. 5.2-3B).

La microscopía electrónica mostró que el epitelio gustativo está constituido por células de tipo poligonal que se van aplanando hacia la superficie libre. Estas células presentan pequeñas microvellosidades de superficie que se interdigitan con las de las células vecinas. Entre estas microvellosidades quedan canales intercelulares de aspecto acuoso (Fig. 5.2-4a). Las células epiteliales tienen citoplasma denso y presentan abundantes tonofilamentos.

Todas las células del epitelio gustativo de la primera semana son similares entre sí. No se observó, con microscopía electrónica, botón gustativo alguno. Esto indica que los observados con microscopía electrónica representan, en realidad, agrupaciones botoniformes de células epiteliales comunes. A diferencia de las células típicas de los botones, las células epiteliales comunes presentan abundantes desmosomas y hemidesmosomas (Fig. 5.2-4b) en la superficie basal que contacta con el conectivo subepitelial. Los nervios del

plexo papilar presentan un aspecto normal. Algunas fibras atraviesan la lámina basal del epitelio gustativo y permanecen en contacto con la superficie basal de algunas células epiteliales. Estas fibras son del tipo terminal y contienen vesículas sinápticas claras y vesículas granuladas (Fig. 5.2-4c). No se observaron fibras nerviosas en zonas más profundas del epitelio.

Segunda semana

El epitelio gustativo de la rata de segunda semana contiene botones en un estado de desarrollo más avanzado que los de primera semana. Esto puede ser evidenciado con cualquiera de las técnicas utilizadas en este estudio:

a) La reacción para AChE muestra fibras nerviosas intracorpúsculares, detalle no observado en los botones de primera semana (ver sección 5.1).

b) La reacción para ATPasa reveló que las células propias de los botones presentan, al igual que las células de Schwann que acompañan a las fibras nerviosas del plexo gustativo, una gran actividad ATPásica.

c) Los botones de segunda semana aparecen perfectamente delimitados del resto del epitelio por una cápsula constituída por células lamelares concéntricas. Es interesante mencionar que estas células son ATPasa negativas al igual que el resto del epitelio gustativo.

d) El análisis de los botones en cortes seriados de Epón mostró que las células gustativas de la segunda semana presentan ya la estructura básica encontrada en los animales

adultos, esto es , una región nuclear localizada aproximadamente en el ecuador de los botones, una prolongación apical y una prolongación basal. El contorno de las células es, sin embargo, algo más irregular que el observado en los animales adultos (Figs. 5.2-5 y 6).

e) El recuento del número total de células por botón en los animales de segunda semana (Fig. 5.2-1) mostró que estas estructuras aumentan el número de sus células. Las cantidades relativas de células oscuras, intermedias y claras varían también enormemente con respecto al animal de primera semana. Los tres tipos celulares aumentan en cantidad, pero el aumento del número de células de tipo oscuro es el más pronunciado. Los botones de segunda semana presentan, por lo tanto, una mayoría de células de tipo oscuro. La Fig. 5.2-7 esquematiza la distribución de las células oscuras en estos botones. Las porciones triangulares, más voluminosas, de estas células corresponden a las regiones nucleares. Estas células oscuras tienen una región nuclear poco voluminosa, ya que el núcleo es filiforme, triangular o globular, pero siempre de pequeño tamaño. Las prolongaciones citoplasmáticas de las células oscuras, aparentemente múltiples, envuelven a las células intermedias.

f) El recuento de figuras mitóticas en el epitelio gustativo del animal de segunda semana reveló un total de 70 en 21 cortes de parafina (cada uno de 12 a 14 micras), cifra ésta, equivalente a la mitad de lo observado , en una cantidad equivalente de cortes, en el animal de primera semana. Las mitosis observadas en el epitelio gustativo

de la segunda semana no aparecen relacionadas con los elementos propios de los botones (Fig. 5.2-3). Solo ocasionalmente se observaron figuras mitóticas en el interior de algún botón gustativo o bien pegadas a las células capsulares a nivel de la porción basal del epitelio (Figs. 5.1-21, 5.2-5 y 6).

g)El estudio del tejido conectivo sobre el cual asienta el epitelio gustativo, mostró la presencia de abundantes fibras nerviosas rodeadas de, por lo menos, dos tipos de células de Schwann. En los cortes de Epón ilustrados por las figuras 5.2-8 y 9, se observa el poro basal de tres botones gustativos, en relación con tractos nerviosos, en su mayoría amielínicos, en los cuales hay células de Schwann de núcleo globular, prominente y un contorno ligeramente irregular. El tamaño de estos núcleos, al igual que el tamaño de los nucleolos y las afinidades tintoriales, son similares a los observados en las células intermedias y claras del interior de los botones. Otras células de Schwann presentan citoplasma oscuro y un contorno irregular similar al de las células oscuras de los botones gustativos. La observación de tractos nerviosos en regiones más alejadas de la base de los botones, muestra también la presencia de los dos tipos de células de Schwann. Las del tipo oscuro son similares a las observadas inmediatamente por debajo del epitelio gustativo, pero las del tipo claro son más pequeñas y menos abundantes. En los cortes de parafina teñidos con hematoxilina-eosina, la existencia de ambos tipos pasa desapercibida debido a la retracción citoplasmáma

tica que sufren todas las células. En estas preparaciones fue posible determinar, de todas formas, que los tractos nerviosos subepiteliales contienen células de Schwann muy parecidas a algunas células de los botones gustativos. En algunos casos, fue posible observar células de Schwann de aspecto fusiforme que, aparentemente, ingresan a los botones gustativos acompañando a las fibras nerviosas (Figs. 5.1-19 y 20).

h) La observación, con microscopía electrónica, de los botones de segunda semana permitió determinar en su interior, la existencia de tres tipos celulares: células intermedias, claras y oscuras. Con microscopía electrónica, las células intermedias presentan cantidades variables de organoides e inclusiones citoplasmáticas; las más ricas en estos elementos darían una coloración intermedia en las preparaciones teñidas para microscopía óptica.

Las células intermedias son elementos estructuralmente polarizados. Como de costumbre, el aparato de Golgi se encuentra localizado en el citoplasma perinuclear, pero en este caso, todos los dictiosomas se encuentran en relación con la superficie apical del núcleo y se extienden considerablemente en el interior de la prolongación citoplasmática correspondiente (Fig. 5.2-10). La prolongación basal y el citoplasma perinuclear contienen abundantes canalículos del retículo endoplásmico granular, polirribosomas y dos tipos de estructuras vesiculares. Unas tienen un diámetro de 400 a 600 Å y su contenido es adielectrónico. Las vesículas del segundo tipo son de mayor tamaño, su diáme

tro varía entre 600 y 1.200 Å y tienen un contenido granu-
lar denso a los electrones (Fig. 5.2-10). Ambos tipos de
vesículas se concentran especialmente en las regiones de
contacto con las fibras nerviosas intracorpúsculares.

Las células intermedias contienen, además, haces com-
pactos de filamentos paralelos. Estos filamentos tienen
50-60 Å de diámetro y son similares a los tonofilamentos
observados en las células oscuras y en el resto de las cé-
lulas del epitelio gustativo. Las células oscuras tienen
un citoplasma muy denso y un núcleo constituido casi ex-
clusivamente por heterocromatina. Su forma es irregular y
emite prolongaciones lamelares muy delgadas que rodean, a
la manera de una vaina, a cada una de las células claras
(Figs. 5.2-10 y 11). De estas prolongaciones lamelares par-
ten microvellosidades cortas que se interdigitan entre sí
en el espacio intercelular amplio que existe en el interior
de los botones. Algunas de estas microvellosidades pene-
tran en invaginaciones superficiales de las prolongaciones
apical o basal de las células claras e intermedias (Figs.
5.2-10 y 11).

Las células oscuras contienen escasos organoides. El
citoplasma está ocupado casi enteramente por tonofilamen-
tos. Las mitocondrias presentan una densidad menor que la
del citoplasma y la mayoría ocupa la región perinuclear.
La estructura de las células oscuras intracorpúsculares es
similar a la de los elementos de la cápsula y del resto
del epitelio, pero no se mantienen unidas entre sí por des-
mosomas.

Las células claras son similares a las intermedias pero presentan menor desarrollo de sus orgánoides y acúmulos de vacuolas con un contenido denso en las vecindades del polo apical (Fig. 5.2-11). El borde libre de estas células presenta microvellosidades y, ocasionalmente, cilios atípicos (Fig. 5.2-12).

El análisis, con el microscopio óptico, de la inervación de los botones gustativos, reveló la presencia de fibras nerviosas amielínicas intraepiteliales, las cuales son rodeadas por laminillas citoplasmáticas de células oscuras. Estas fibras se concentran alrededor de la porción nuclear y la porción basal de las células claras, pero es frecuente observar fibras nerviosas separadas de las células claras por laminillas de células oscuras. Los escasos contactos observados entre las fibras, las terminaciones nerviosas y la membrana de las células claras, no presentan un aparato sináptico visible ni ningún tipo de especializaciones de contacto. El citoplasma de las células claras e intermedias adyacentes a estos contactos, presenta las vesículas que describimos anteriormente. Las terminaciones nerviosas contienen abundantes vesículas, y éstas son similares a las denominadas "vesículas sinápticas claras" (Fig. 5.2-10). Algunas pocas fibras y terminaciones intracorpúsculares presentaron vesículas granuladas de 600 a 800 Å.

El análisis del poro basal de los botones gustativos mostró que las prolongaciones correspondientes de las células claras penetran a veces en el tejido conectivo donde permanecen rodeadas por una típica lámina basal (Fig.

5.2-13). Resultó imposible establecer diferencias entre las laminillas de las células de Schwann que rodean a las fibras subepiteliales y las laminillas de las células oscuras que, como hemos visto, sirven de aislante a las fibras intraepiteliales.

Una minoría de las células de Schwann subepiteliales presenta un citoplasma globular y contiene abundantes elementos de retículo endoplásmico y ribosomas. Las prolongaciones citoplasmáticas de estas células son voluminosas, siendo frecuente observar una sola fibra nerviosa rodeada por este tipo de citoplasma (Fig. 5.2-14). Por el contrario, las células de Schwann de tipo oscuro presentan un citoplasma rico en filamentos e incluyen grupos de 7 a 9 fibras nerviosas subepiteliales (Fig. 5.2-14).

El análisis de los nervios y del ganglio papilar del animal de segunda semana reveló que en estos sitios alejados del epitelio existen también los dos tipos mencionados de células de Schwann. Se observaron además, indicios de que el proceso de mielinización de las fibras nerviosas gustativas no se ha completado aún en este estadio (Fig. 5.2-15).

Tercera semana

La figura 5.2-16, muestra cortes seriados del epitelio gustativo de una rata de tercera semana. La figura 5.2-17, representa una reconstrucción estructural de algunos botones gustativos en sección oblicua y transversal.

Los botones de tercera semana incluídos en Epón, tie

nen forma y tamaño más regular que los observados en el animal de segunda semana. Su contorno aparece también perfectamente delimitado por células capsulares aplanadas. En algunos cortes favorables, la distribución de las células oscuras aparece bastante simétrica. Los botones 1 a 4 de la Fig. 5.2-16 han sido seriados oblicuamente a nivel del plano ecuatorial. Pueden observarse allí , perfiles tri-angulares o romboidales de las células oscuras formando un estrato subcapsular. Algunos perfiles aparecen también en regiones más profundas del botón , pero éstos son menos abundantes aunque siguen estando regularmente espaciados. Las células claras y las células intermedias pueden ser detectadas con facilidad, por el tamaño del núcleo y la abundancia y palidez del citoplasma.

El número total de células por botón en estas preparaciones fue por término medio, de 23 por corte, cantidad ésta, ligeramente superior a lo observado en el animal de segunda semana (Fig. 5.2-1), pero las proporciones relativas de cada uno de los tipos celulares han sufrido variaciones importantes. Las células de tipo oscuro han aumentado en número con respecto a la segunda semana (Fig. 5.2-1), siguiéndoles en orden de cantidad, las intermedias y finalmente, las claras. En los botones de tercera semana, el número de células intermedias duplica aproximadamente al número correspondiente de la semana anterior. Sin embargo, en el animal de tercera semana, persiste aproximadamente un 10% de botones gustativos similares a los botones inmaduros observados durante la segunda semana.

El recuento de figuras mitóticas en el epitelio gustativo del animal de tercera semana (cortes de parafina teñidos con hematoxilina-eosina), reveló una notable disminución en la cantidad de divisiones celulares (Figs. 5.1-25 y 26). Solamente dos imágenes mitóticas fueron detectadas en la porción basal del epitelio después del análisis de 17 secciones, lo que da un promedio de 0.1 por corte. En los cortes de Epón, se observó ocasionalmente una célula mitótica a nivel del poro basal de algún botón (Fig. 5.2-18). Las Figs. 5.2-18 y 19, muestran botones gustativos con poros basales bien evidentes. En el tejido conectivo subepitelial se observan abundantes haces de fibras nerviosas amilínicas (Fig. 5.2-19). Las células de Schwann presentan núcleos voluminosos similares a los observados en las células claras e intermedias de los botones. En las proximidades del poro basal aparecen también algunos elementos de tipo fusiforme que aparentemente se relacionan con las células capsulares de los botones. Inmediatamente por debajo del poro basal, es frecuente encontrar en el conectivo, una célula de citoplasma claro. Esta puede corresponder a una célula de Schwann anexa al botón o bien a una célula gustativa que se ha formado por fuera del poro basal (fig. 5.2-18).

El estudio de los botones gustativos de tercera semana con microscopía electrónica, mostró botones de mayor tamaño y mejor definidos que los observados durante la segunda semana. Las células capsulares, idénticas a las que forman el resto del epitelio, forman laminillas aplanadas

rodeando al botón y se mantienen unidas entre sí por abundantes desmosomas (Fig. 5.2-20). En el interior del botón se observan células intermedias y claras similares a las descritas anteriormente en los botones de segunda semana. Estas células aparecen bien delimitadas por prolongaciones citoplasmáticas de las células oscuras. Las células propias de los botones se interrelacionan por simple aposición de membranas, no observándose desmosomas ni ningún otro tipo de especializaciones de unión, excepto a nivel del poro apical donde, como ya ha sido descrito por otros autores, existen complejos de unión (Figs. 5.2-21 a 24). Las características generales de los botones de tercera semana son esencialmente similares a las del animal adulto.

Animal adulto

Las tinciones con AChE y ATPasa en la papila del animal adulto, mostraron una reacción similar a la observada durante la segunda y tercera semana (Figs. 5.2-25 y 26). Los cortes de Epón teñidos con toluidina-bórax, revelaron que la proporción de células oscuras, intermedias y claras varía con respecto a los botones de tercera semana (Fig. 5.2-1). El número de células por corte, en los botones gustativos del animal adulto, es algo menor que el de los de la tercera semana. En estos botones se observó, con mayor claridad que en los de la tercera semana, que las células claras presentan una región nuclear más apicalmente localizada que la de los otros tipos celulares. Esquemáticamente podríamos decir que la mayor parte de las células os

curas tiene su núcleo a nivel del tercio basal del botón, las células intermedias a nivel del tercio medio y las células claras a nivel del tercio apical. Es frecuente observar uno o más núcleos de células claras muy próximos al polo apical. En cortes transversales, esta distribución de los núcleos celulares obliga a determinar el plano en que los botones han sido seccionados, con anterioridad a efectuar recuentos celulares. Cuando no es posible establecer este plano, los botones deben ser descartados, ya que los resultados a obtener no corresponderían con la realidad.

El análisis con microscopía electrónica de los botones adultos, permitió observar una transición gradual entre los tres tipos celulares que conforman estas estructuras. El aspecto de estos botones es comparable a los de tercera semana. Las células oscuras contienen, además de los tonofilamentos y mitocondrias ya descritos, numerosos gránulos densos en el citoplasma apical (Fig. 5.2-27). Estas son, aparentemente, las células más primitivas del sistema. Junto a elementos de este tipo, se observan células también del tipo oscuro pero cuyo citoplasma ha perdido densidad y contiene un menor número de las inclusiones granulares recién mencionadas. Otras células oscuras presentan abundantes elementos del retículo endoplásmico y un aparato de Golgi bien desarrollado. Estas células podrían ya considerarse como elementos del tipo intermedio (Fig. 5.2-28). Llamó la atención la existencia de un artefacto de preparación localizado exclusivamente en las células oscuras y en las intermedias más inmaduras. Este artefacto consistió en una dilatación

tación considerable de todo el sistema canalicular, incluyendo a las cisternas perinucleares. Las células intermedias propiamente dichas y las células claras mostraron, por el contrario, un sistema canalicular normal.

Las células claras presentaron escasos elementos del retículo endoplásmico y abundantes vacuolas y cuerpos densos de tipo lisosómico (Fig. 5.2-29).

En los tres tipos celulares que hemos mencionado, predominan los ribosomas libres sobre los polirribosomas. Por el contrario, las células capsulares contienen casi exclusivamente polirribosomas (Fig. 5.2-28) al igual que en el animal de tercera semana (comparar con las Figs. 5.2-20 y 21).

Los tres tipos de células intracorpúsculares se encuentran unidos entre sí por interdigitaciones citoplasmáticas y muy escasas diferenciaciones desmosómicas, excepto en la porción apical de los botones, en los sitios cercanos al poro gustativo apical (Fig. 5.2-30). Las células capsulares se encuentran intimamente adheridas entre sí y a todo lo largo de su superficie, por abundantes desmosomas de mediano tamaño (Fig. 5.2-28).

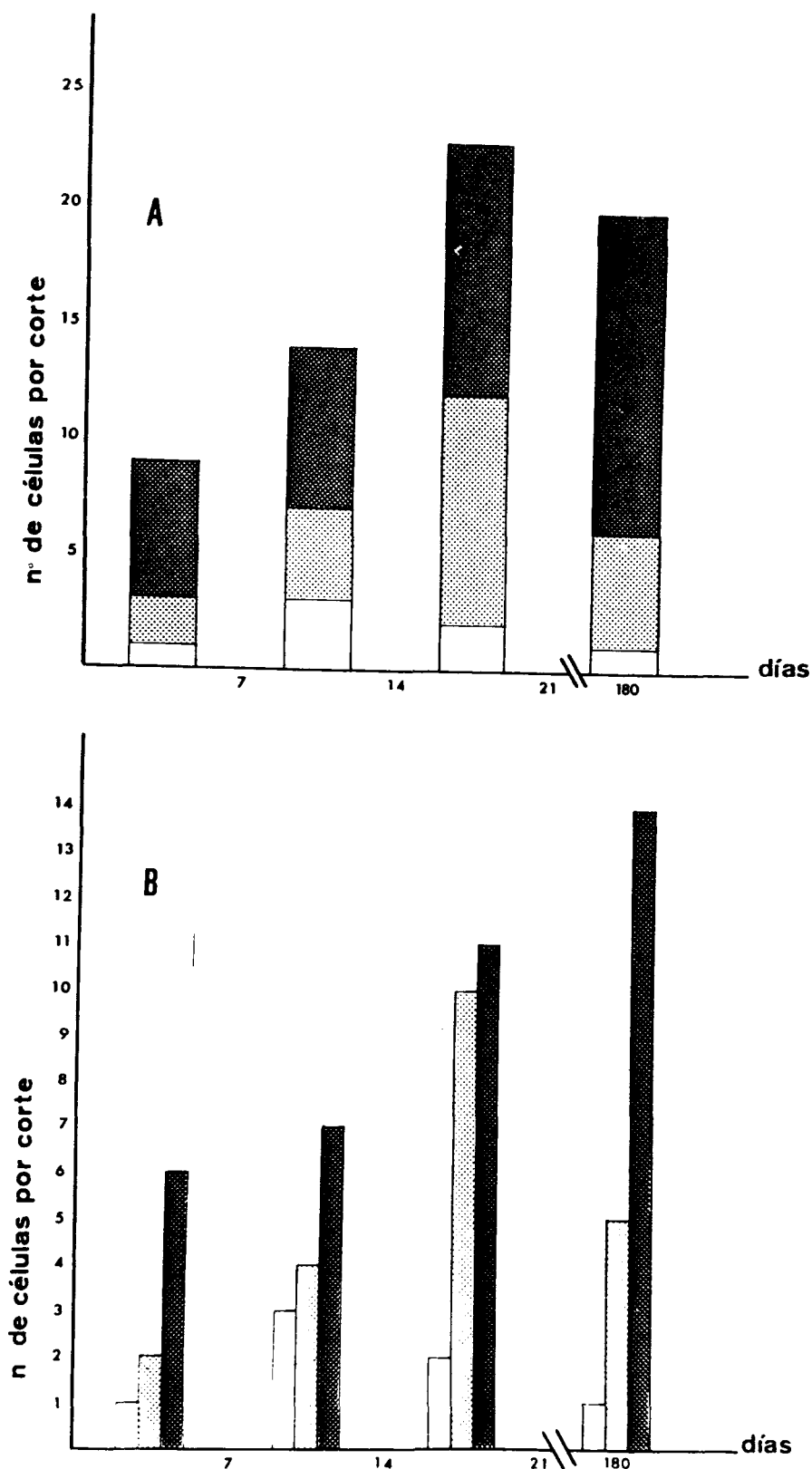


Fig. 5.2.1.- Histogramas, mostrando el número medio de células por corte, en los botones gustativos de los animales de distintas edades. El recuadro blanco representa las células claras, el punteado fino, las células intermedias y el punteado grueso, las oscuras. En el esquema A se representa el número total de células y en el esquema B, el número de cada uno de los tipos celulares.

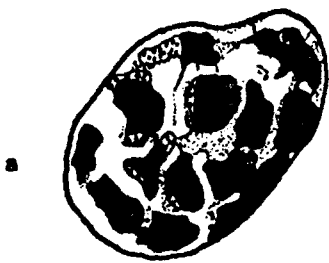


Fig. 5.2-2a.

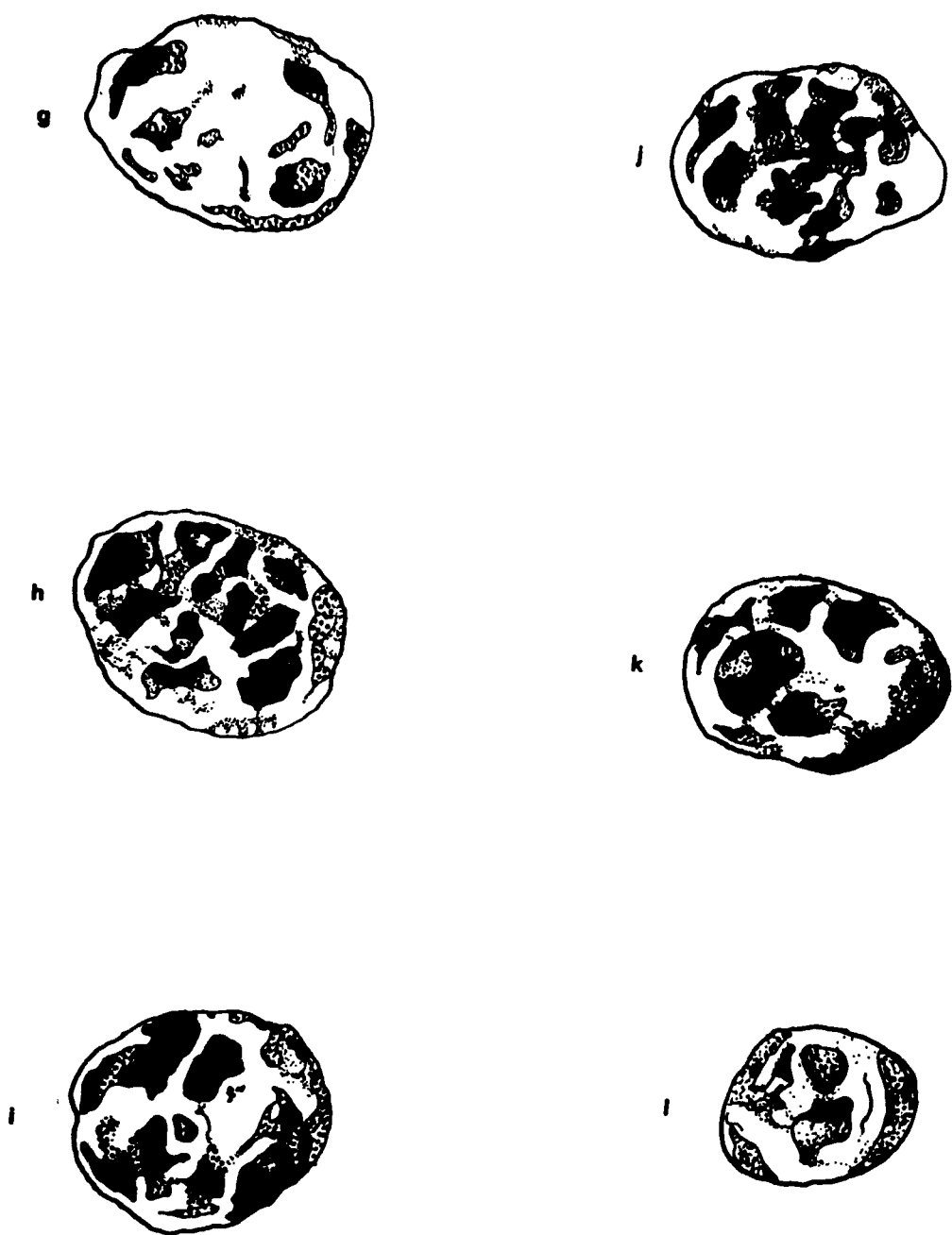


Fig. 5.2-2b.

Fig. 5.2-2.- Esquema de los cortes seriados a 1 micra de espesor, de un botón gustativo del animal de primera semana. Han sido calcados de las fotografías originales.

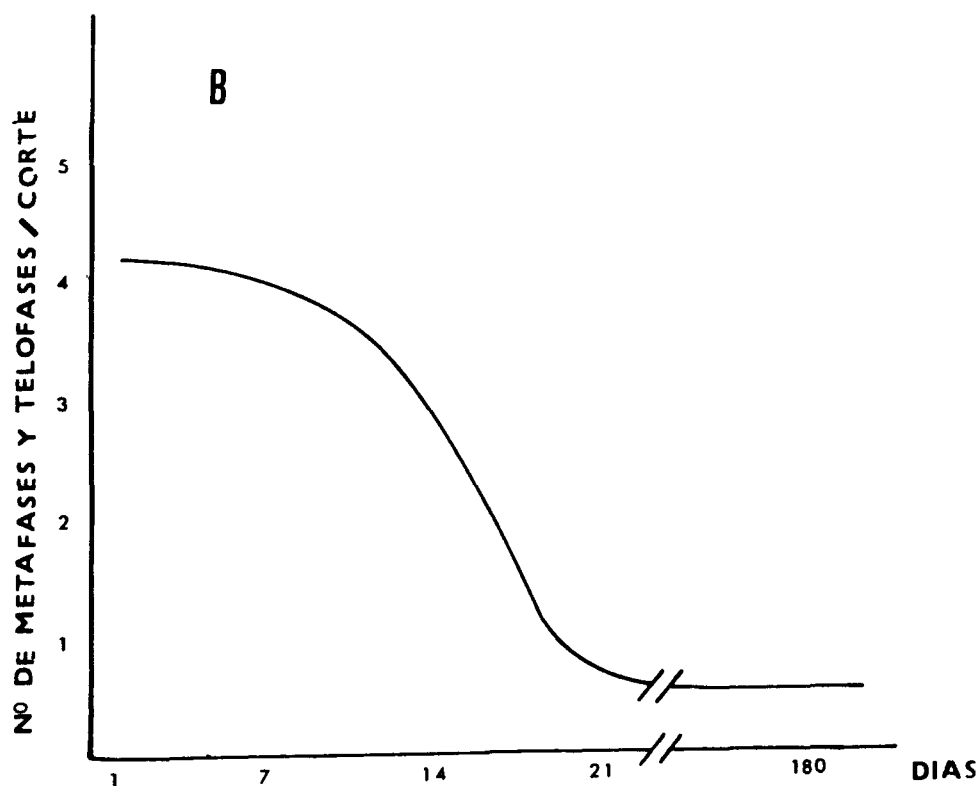
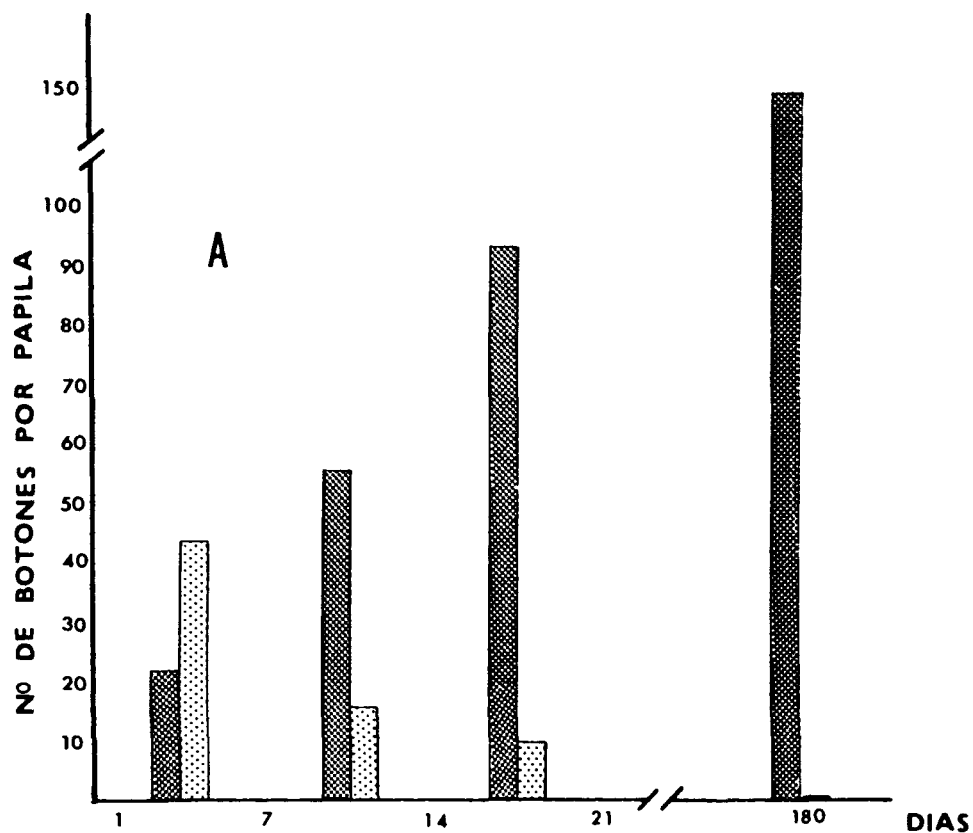


Fig. 5.2-3.- A: Histograma indicativo del número total de botones por cada papila circunvalada en animales de distintas edades. El punteado grueso representa botones típicos y el punteado fino, botones inmaduros. B: Representación gráfica de la relación entre el número de mitosis en el epitelio gustativo y la edad del animal.

Fig. 5.2-4a.- Cé-
lula del epitelio
gustativo de un ani-
mal de la primera
semana. Flechas: es-
pacios intercelula-
res. 12.000x.

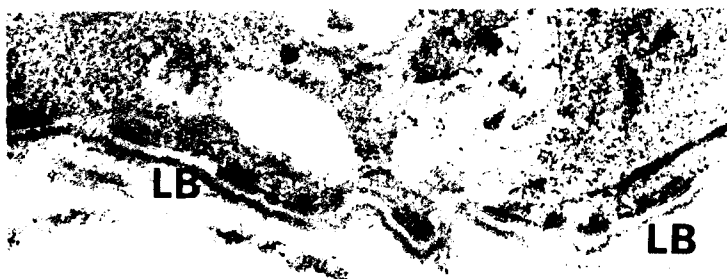
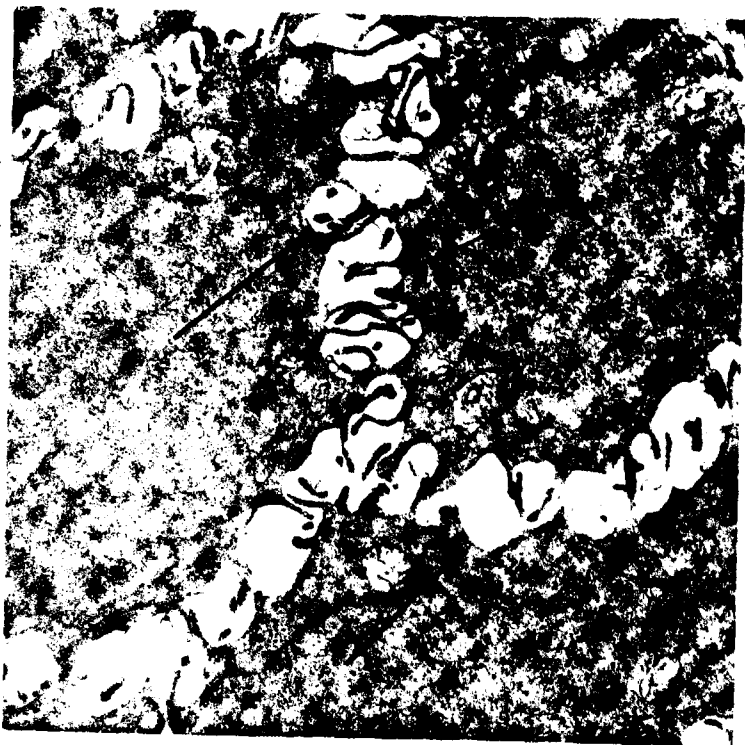


Fig. 5.2-4b.- Superficie basal de las células del epitelio
gustativo mostrando hemidesmosomas y una lámina basal de
alta densidad electrónica (LB). 50.000x.



Fig. 5.2-4c.- Fibras nerviosas en contacto con la super-
ficie basal del epitelio gustativo. Estas fibras contienen
vesículas y están separadas del conectivo por la lámina
basal del epitelio. 25.000x.



Fig. 5.2-5a.

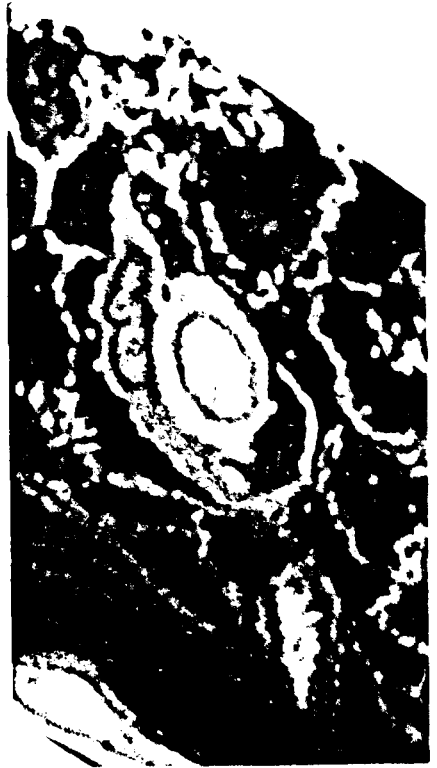


Fig. 5.2-5c.

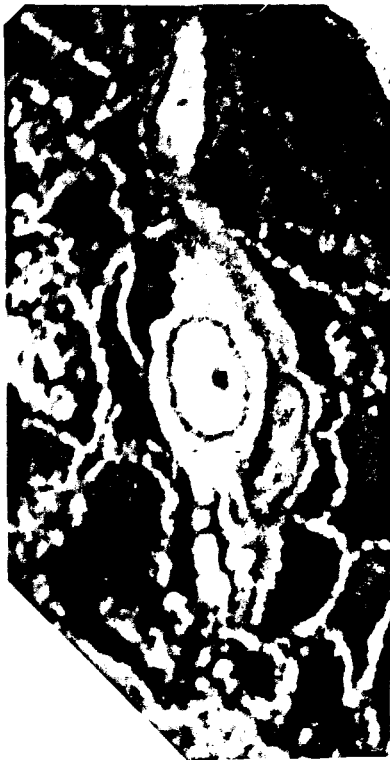


Fig. 5.2-5b



Fig. 5.2-5d.



Fig. 5.2-5e.



Fig. 5.2-5g.



Fig. 5.2-5f.



Fig. 5.2-5h



Fig. 5.2-5h.

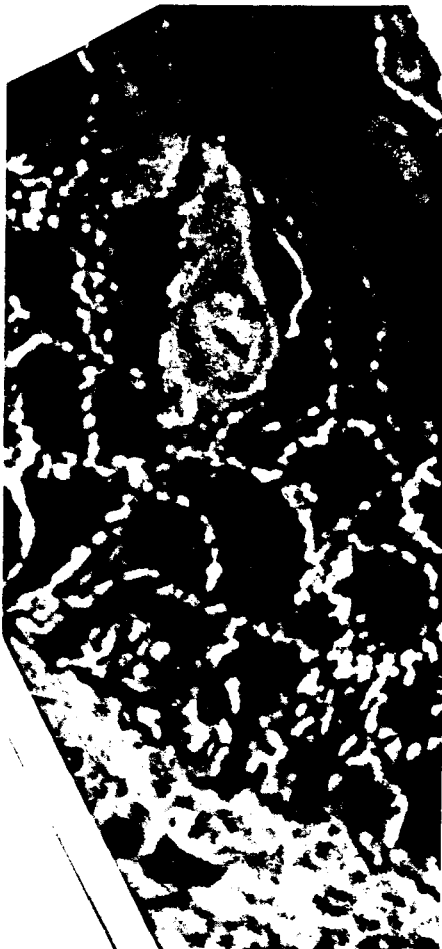


Fig. 5.2-5i.

Fig. 5.2-5.- Botón gustativo de segunda semana. Inclusión: Epón. Coloración: toluidina-bórax. Cortes: 1 micra de espesor. En los cortes 5a a 5d, el botón aparece constituido por una célula intermedia y una célula clara más voluminosa. Estos elementos están rodeados por células epiteliales que no conforman una cápsula bien definida. Las figuras 5e a 5i, representan cortes longitudinales del mismo botón, que corresponden a la porción central, más abultada, y muestran un mayor número de células que en las figuras 5a a 5d. Puede observarse en este botón, una célula clara, tres intermedias y una célula oscura con prolongaciones que se insinúan entre los otros tipos celulares. Bordeando a las células claras e intermedias, se observan prolongaciones citoplasmáticas de células oscuras, en corte longitudinal y transversal. El botón está circunscrito por células oscuras aplanadas. Continuando con las secciones seriadas, llega un momento en que aparece solamente una célula clara rodeada de células oscuras poco diferenciadas (figura 5i). Es común observar, en preparaciones aisladas, la presencia de células únicas de este tipo. 1.000x.

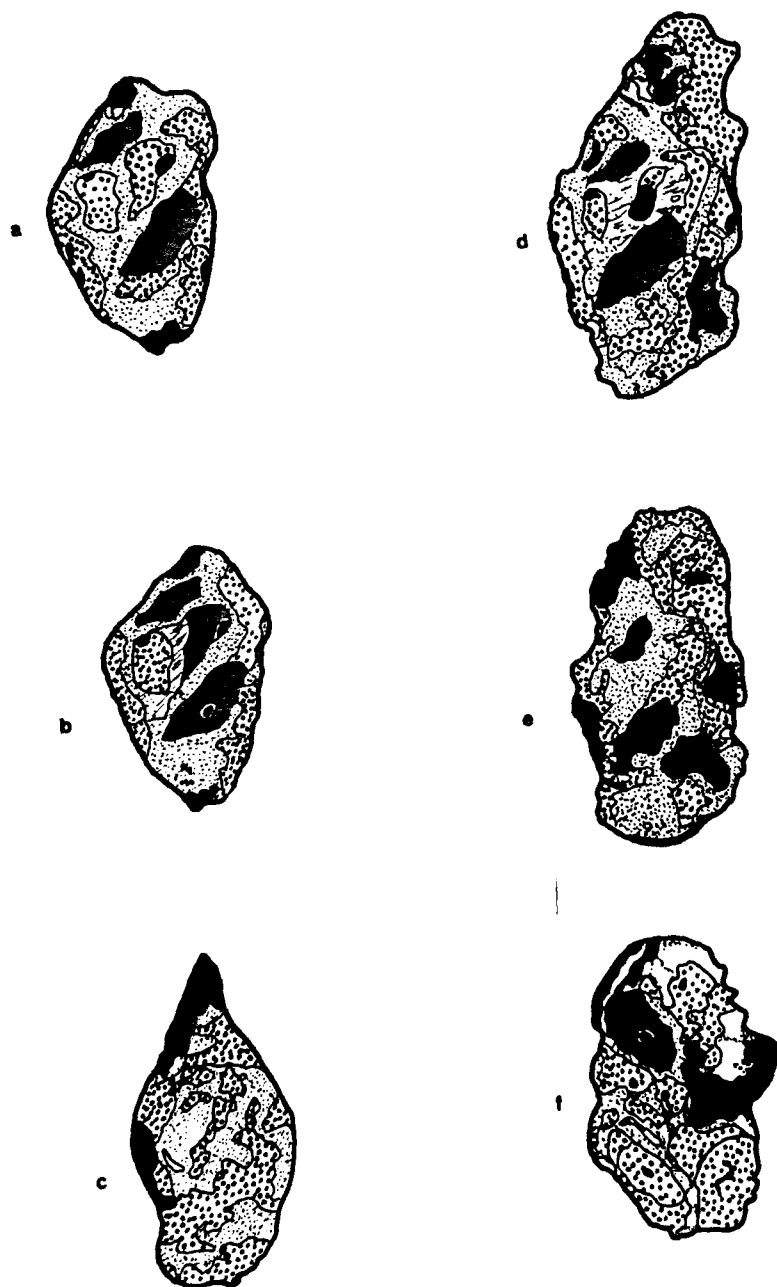


Fig. 5.2-6a.

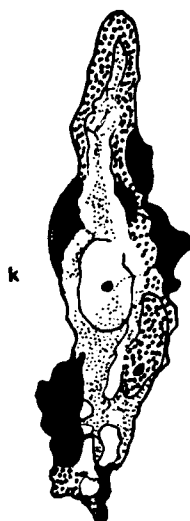
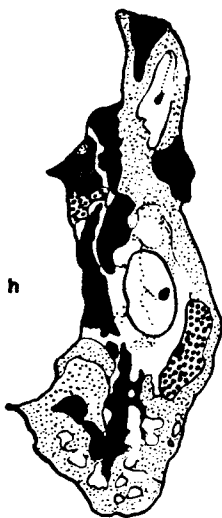
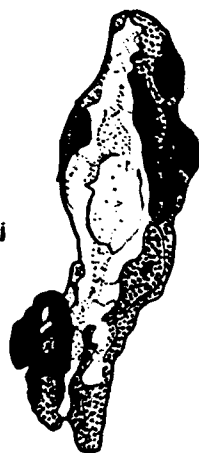


Fig. 5.2-6b.

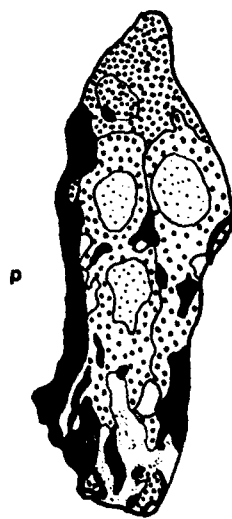
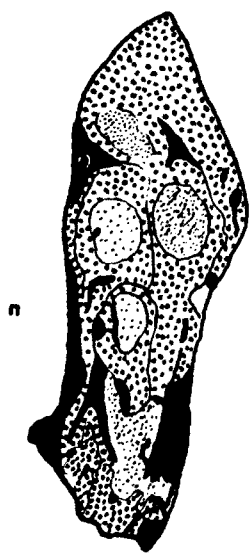
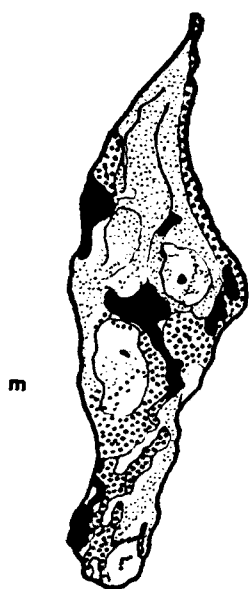


Fig. 5.2-6c.

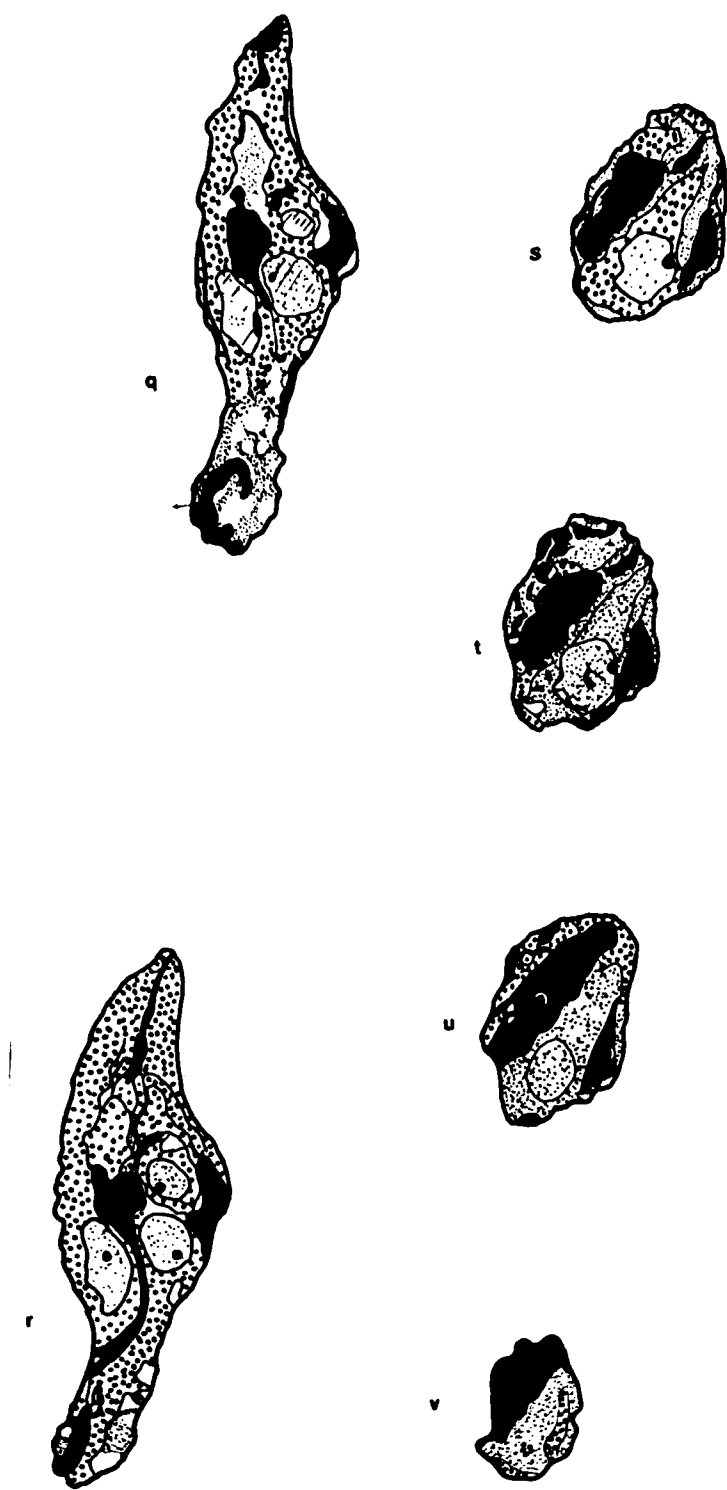


Fig. 5.2-6d.

Fig. 5.2-6.- Esquema de un botón gustativo en cortes seriados de una micra de espesor. Animal de segunda semana.

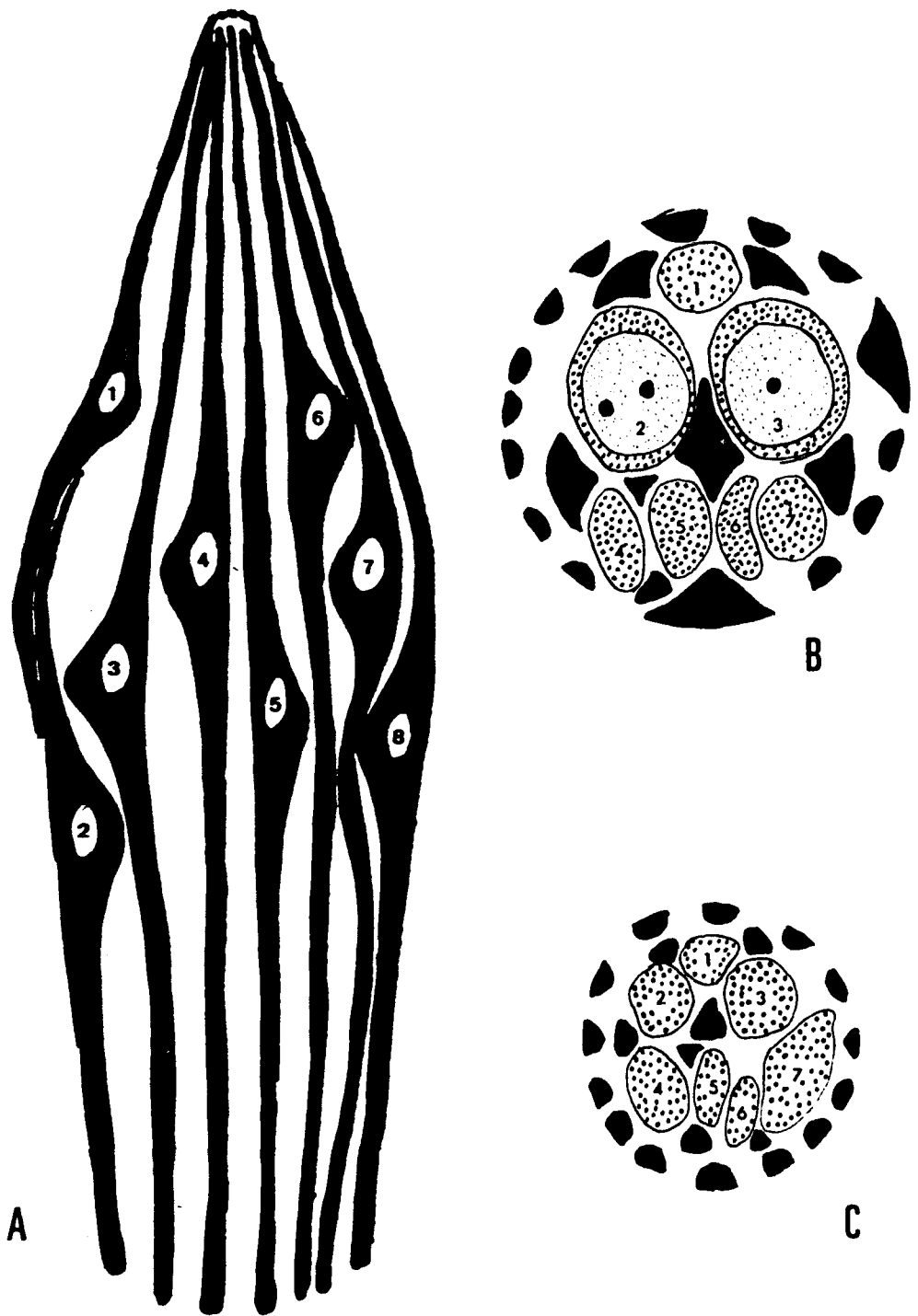


Fig. 5.2-7.- Esquema de un botón del animal de segunda semana. A: vista longitudinal mostrando gran cantidad de células oscuras periféricas. B: corte transversal del botón a nivel superior. Las células oscuras se encuentran también entre las células claras e intermedias. C: corte transversal del botón a nivel inferior.



Fig. 5.2-8.- Tejido conectivo bajo el epitelio gustativo. Animal de segunda semana. A: célula de Schwann de citoplasma oscuro. B: célula de Schwann de citoplasma claro, comparable a las células intracorporales de un botón en formación (flechas). Inclusión: Epón. Coloración: toluidina-bórax. 1.000x.



Fig. 5.2-9.- Otra sección del mismo animal de segunda semana. Las células de Schwann de tipo claro (flechas) son semejantes a las intracorpúsculares (I). M: mitosis. 1000x.



Fig. 5.2-10.- Células intermedias en un animal de segunda semana. CG: complejo de Golgi. RE: retículo endoplásmico. M: mitocondrias. O: células oscuras. S: sinapsis receptoneurales. 25.000x.

Fig. 5.2-11.- Citoplasma apical de una célula clara de segunda semana. G: gránulos densos rodeados por una membrana simple. F: filamentos. O: células oscuras. 50.000x.

Fig. 5.2-12.- Corte transversal de microvellosidades (flechas) y un cilio, de una célula clara del animal de segunda semana. 100.000x.



Fig. 5.2-11.

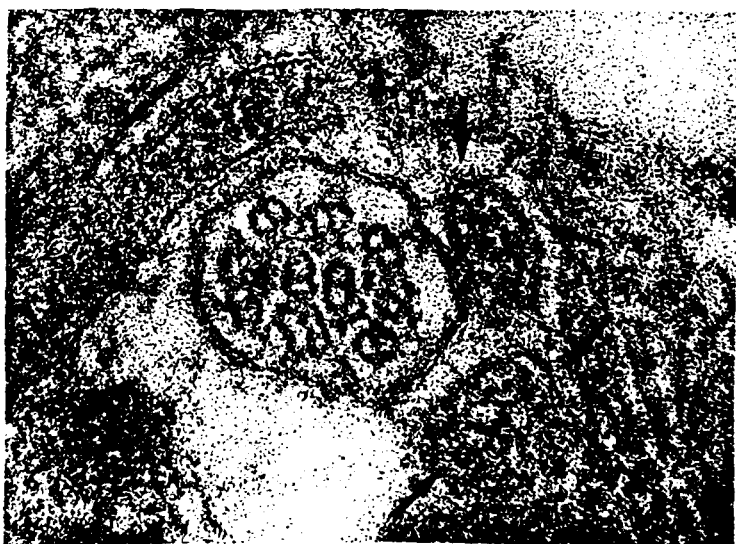


Fig. 5.2-12.



Fig. 5.2-13a y b.- Base del epitelio gustativo (E) de un animal de segunda semana mostrando la penetración de las fibras nerviosas (FN) y prolongaciones citoplasmáticas de las células epiteliales introduciéndose en el tejido conectivo (TC). Los elementos epiteliales pueden distinguirse de los conectivos porque aparecen rodeados por una lámina basal (LB). 35.000x.

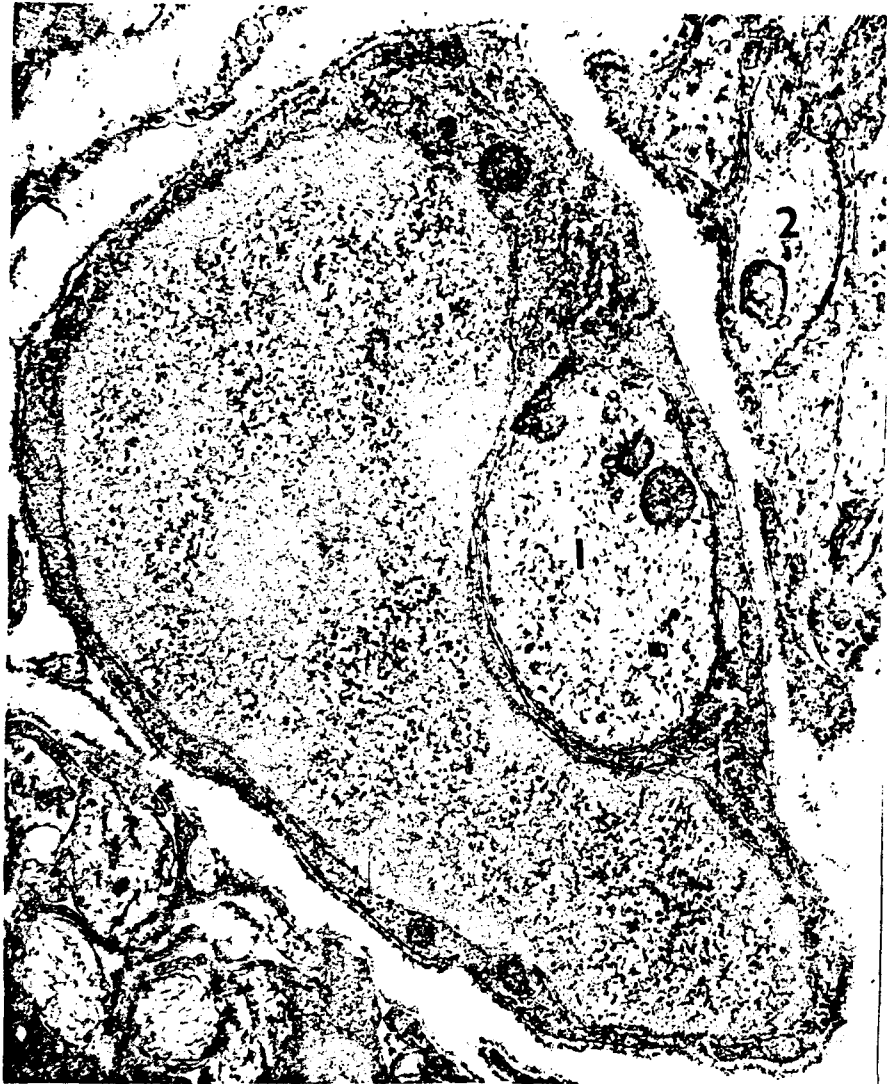


Fig. 5.2-14.- Célula de Schwann globulosa incluyendo una sola fibra nerviosa. 1 y 2: grupos de fibras rodeados por laminillas densas de células de Schwann. 15.000x.



Fig. 5.2-15a.- Diversos tipos de fibras mielínicas en el eje papilar, en el animal de segunda semana. Flecha: mielina inmadura. 5.000x.

Fig. 5.2-15b.- M: mielina inmadura de tipo laxo. F: fibra nerviosa con neurofilamentos. 50.000x.



Fig. 5.2-16a.



Fig. 5.2-16b.

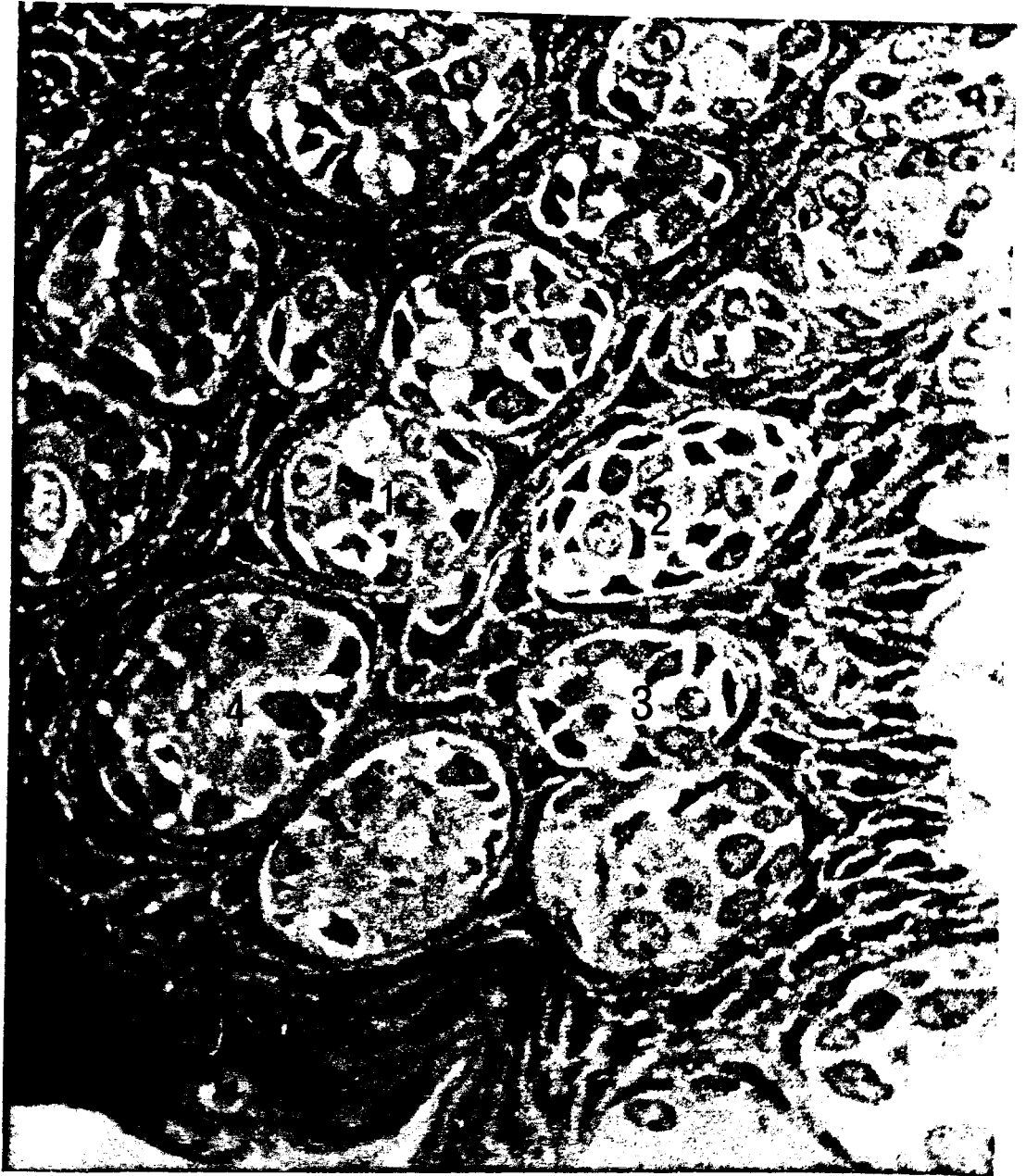


Fig. 5.2-16c.



Fig. 5.2-16d.

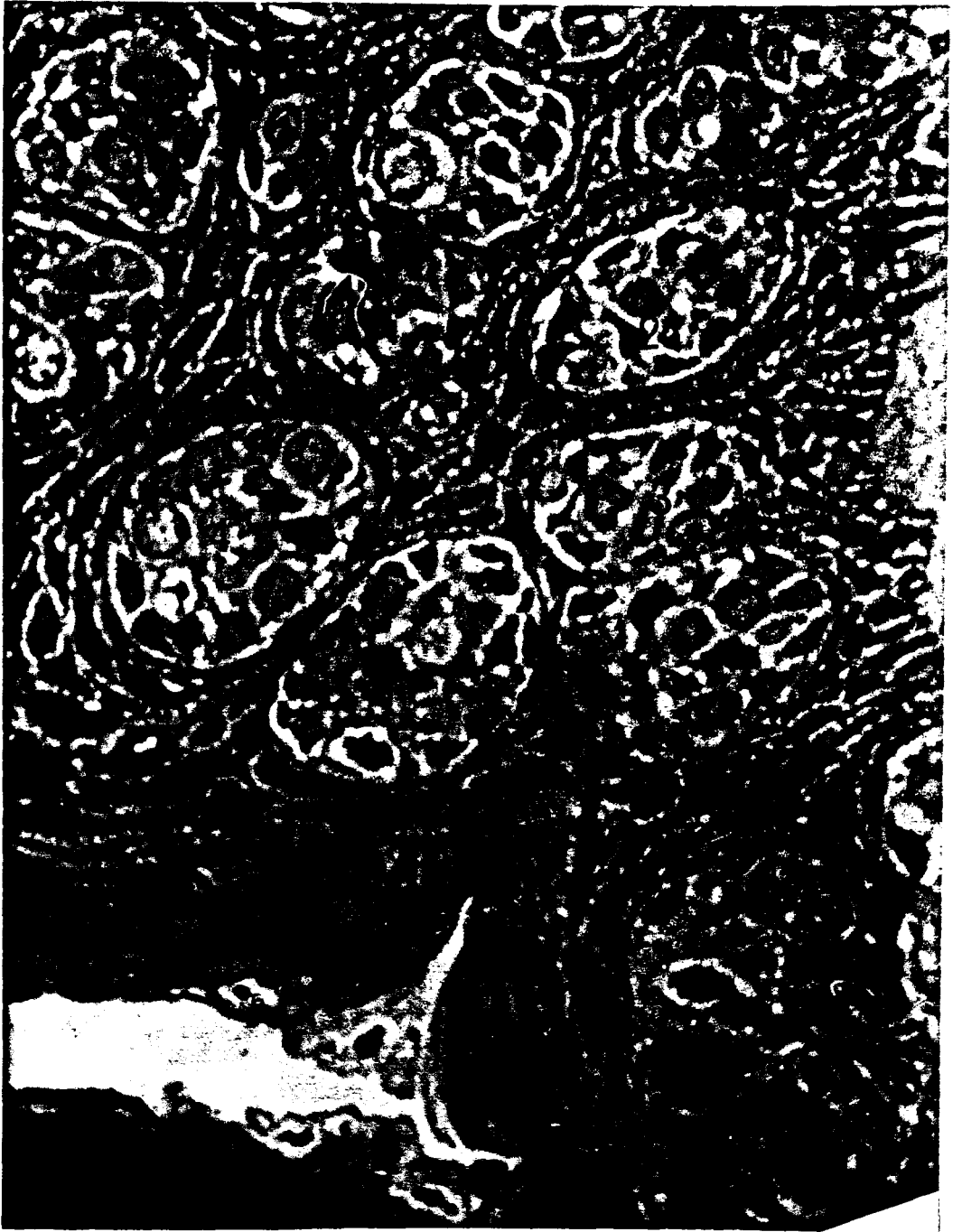


Fig. 5.2-16e.



Fig. 5.2-16f.



Fig. 5.2-16g.



Fig. 5.2-16h.



Fig. 5.2-16i.

Fig. 5.2-16.- Superficie lateral de una papila de la tercera semana. Los botones 1 a 4, permiten analizar con facilidad el número y la proporción de células oscuras, intermedias y claras. 1.000x.

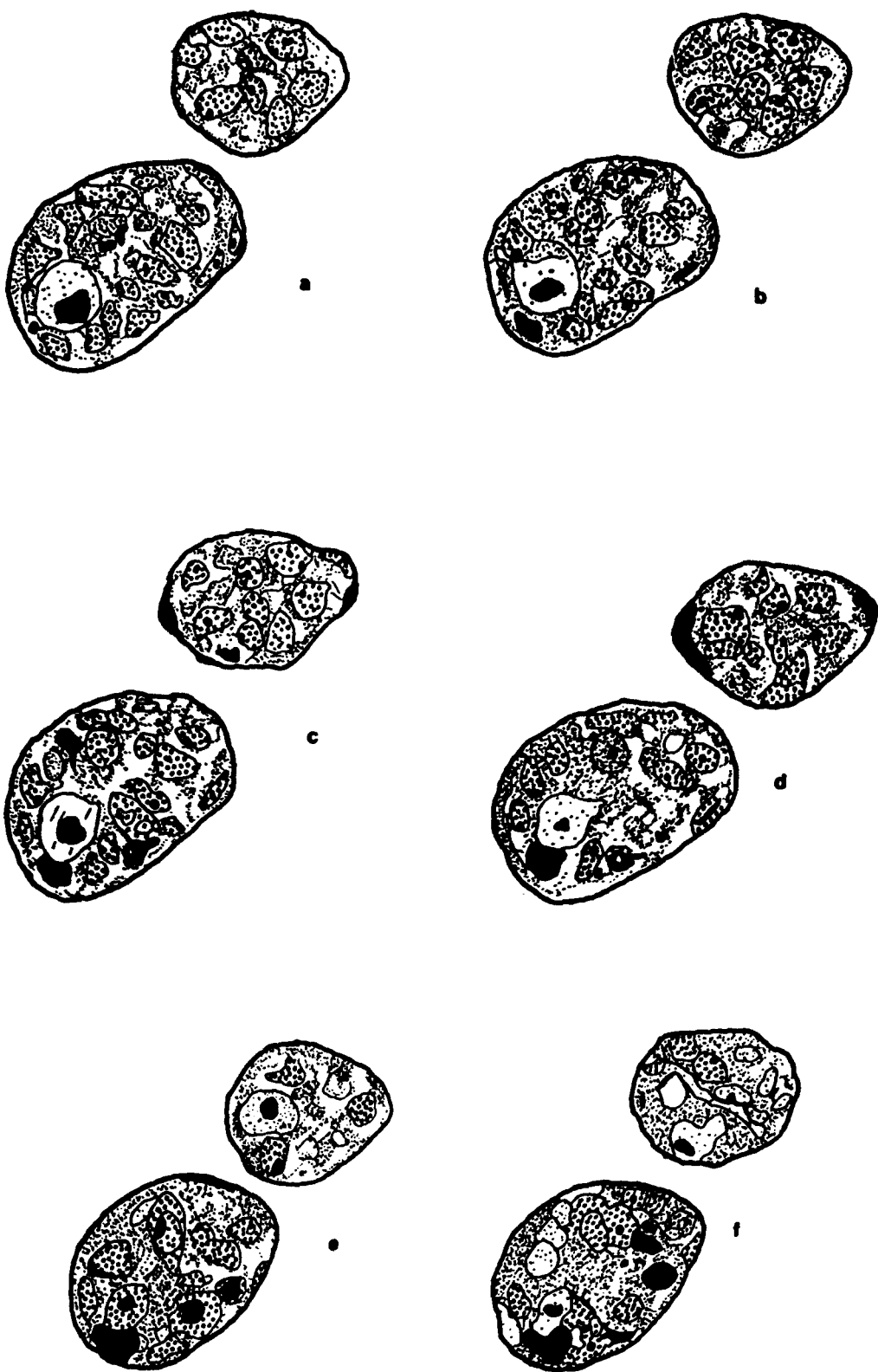


Fig. 5.2-17a.

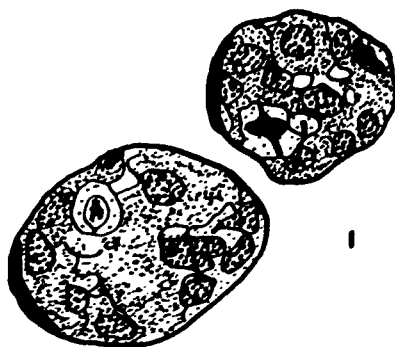
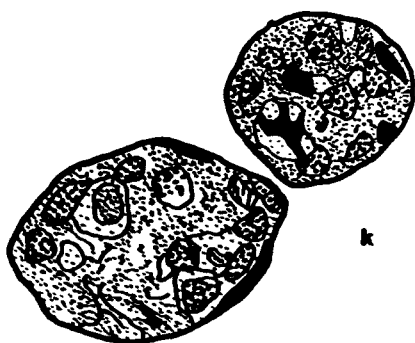
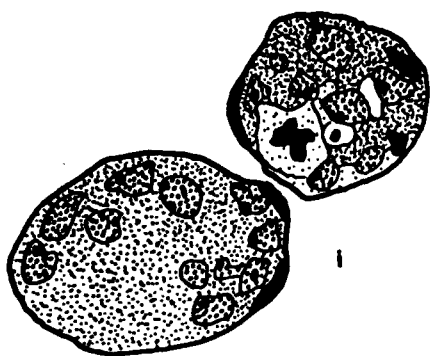
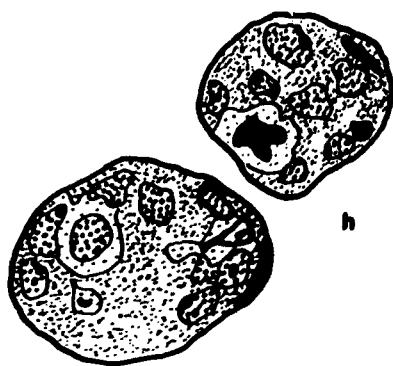
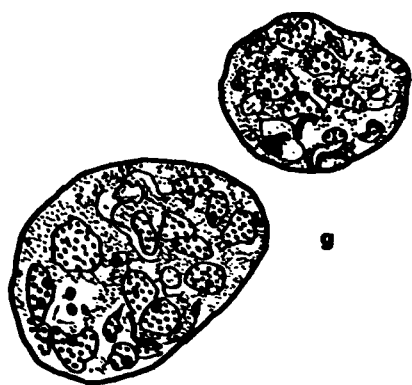


Fig. 5.2-17b.

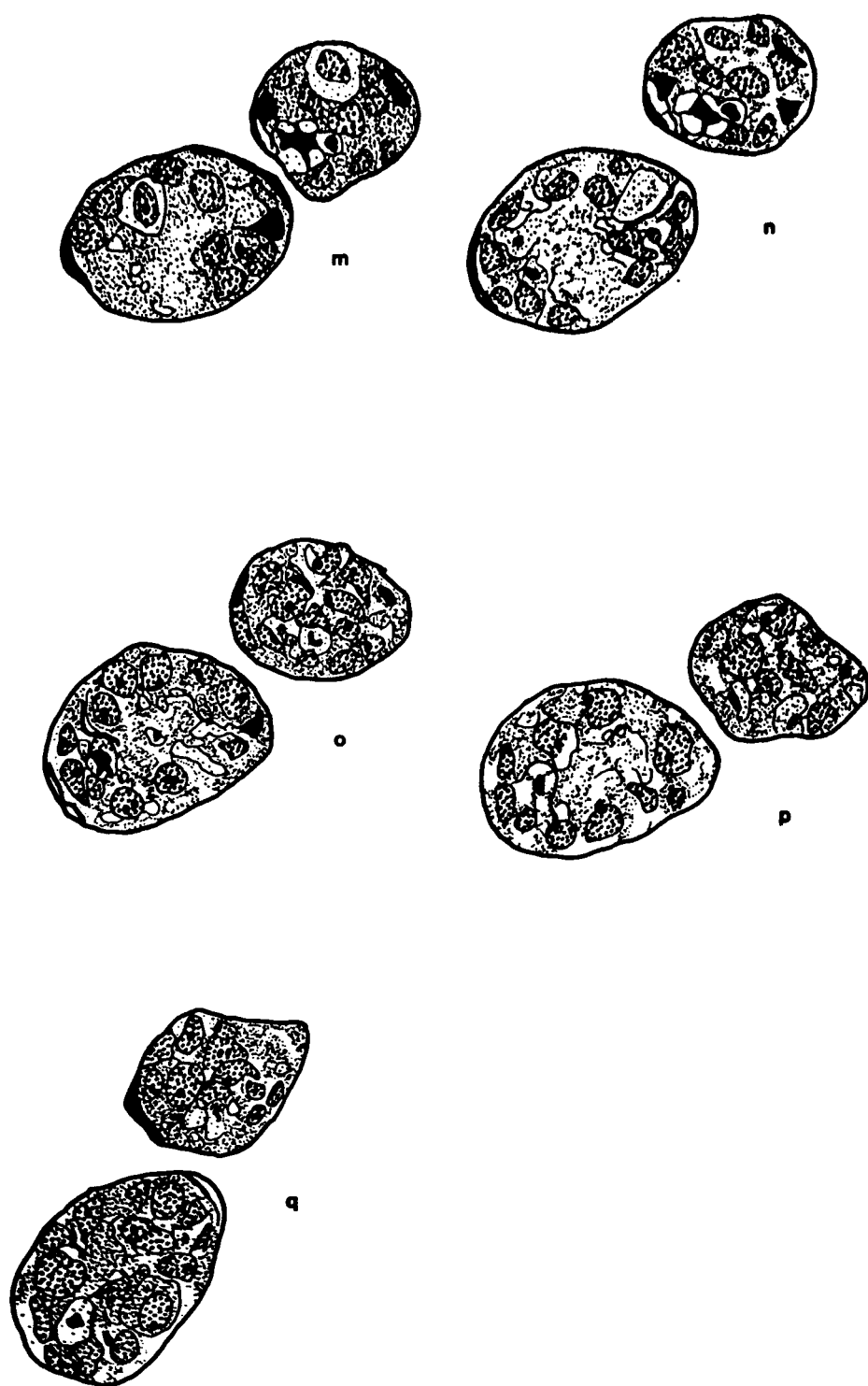


Fig. 5.2-17c.

Fig. 5.2-17.- Esquema de un botón gustativo en cortes seriados de una micra de espesor. Animal de tercera semana.



Fig. 5.2-18.- Fondo de surco. Animal de tercera semana. Flechas: mitosis en la parte basal de un botón. Los poros basales son muy evidentes. Inclusión: Epón. Coloración: toluidina-bórax. 1.000x.



Fig. 5.2-19.- Fondo de surco del animal de tercera semana, mostrando un botón gigante (G). En el conectivo subyacente aparecen fibras nerviosas amielínicas (F). S: surco. 1000x.



Fig. 5.2-20.- Células capsulares de un botón gustativo de tercera semana. N: núcleos. D: desmosomas. F: tonofilamentos. 50.000x.



Fig. 5.2-21.- Célula intermedia (prolongación apical). Nótese la ausencia de especializaciones de unión entre estas células y las células oscuras (O) adyacentes. V: vesículas. F: filamentos. 50.000x.



Fig. 5.2-22.- Células periféricas (P) de un botón gustativo, y células capsulares (C). Las células capsulares están unidas por desmosomas (D) y contienen mayor cantidad de filamentos y ribosomas. 50.000x.



Fig. 5.2-23.- Diversos estadios de transición entre células oscuras e intermedias. La célula 1 contiene un aparato de Golgi y un sistema canalicular muy desarrollado y el citoplasma aparece ocupado por vesículas pequeñas derivadas del Golgi. La célula 2 presenta citoplasma más claro y contiene también abundantes elementos vesiculares. 50.000x



Fig. 5.2-24.- Polo apical de dos células claras separadas por una célula oscura. V: vacuolas de gran tamaño. 25.000x.



Fig. 5.2-25.- Corte transversal de la papila de un animal adulto. Tinción: AChE-azul de toluidina. La reacción es semejante a la de los animales de segunda y tercera semana. 100x.

Fig. 5.2-26.- Papila de un animal adulto. Tinción: ATPasa. La reacción también es semejante a la de los animales de segunda y tercera semana. 100x.





Fig. 5.2-27.- Citoplasma supranuclear de una célula de tipo oscuro (animal adulto). El retículo endoplásmico y el complejo de Golgi (RE y CG) aparecen dilatados. El citoplasma es denso y contiene numerosas vesículas de 400 Å y vesículas granuladas de 600 a 1000 Å. M: mitocondrias. 30.000x.



Fig. 5.2-28.- Porción periférica de un botón gustativo (animal adulto). La línea de puntos delimita la cápsula del botón (derecha), con células ricas en polirribosomas y filamentos (flechas) y una célula intermedia gustativa (izquierda) con un aparato de Golgi muy desarrollado (AG), ribosomas aislados (flechas) y numerosas vacuolas. FN: fibras nerviosas. N: núcleos. 10.000x.

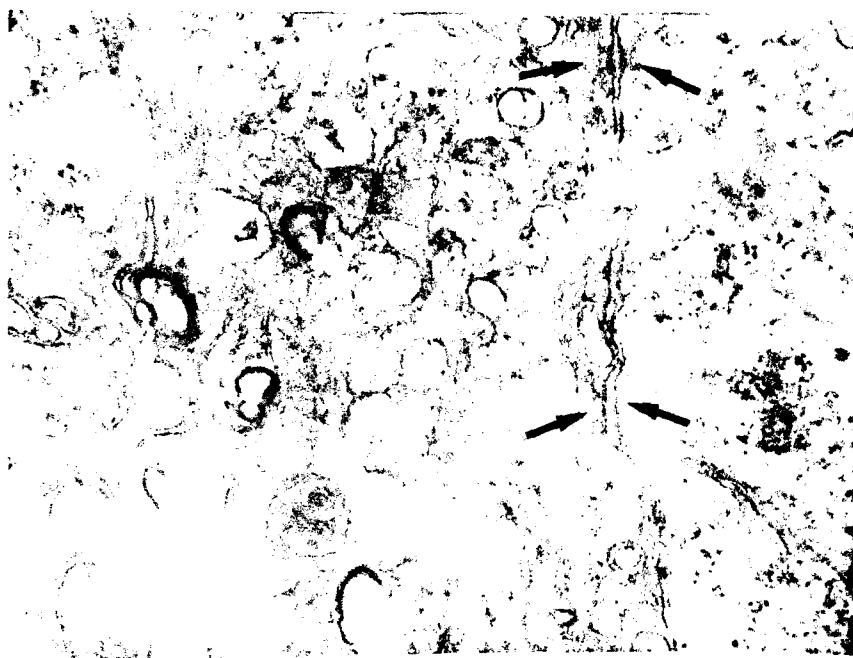
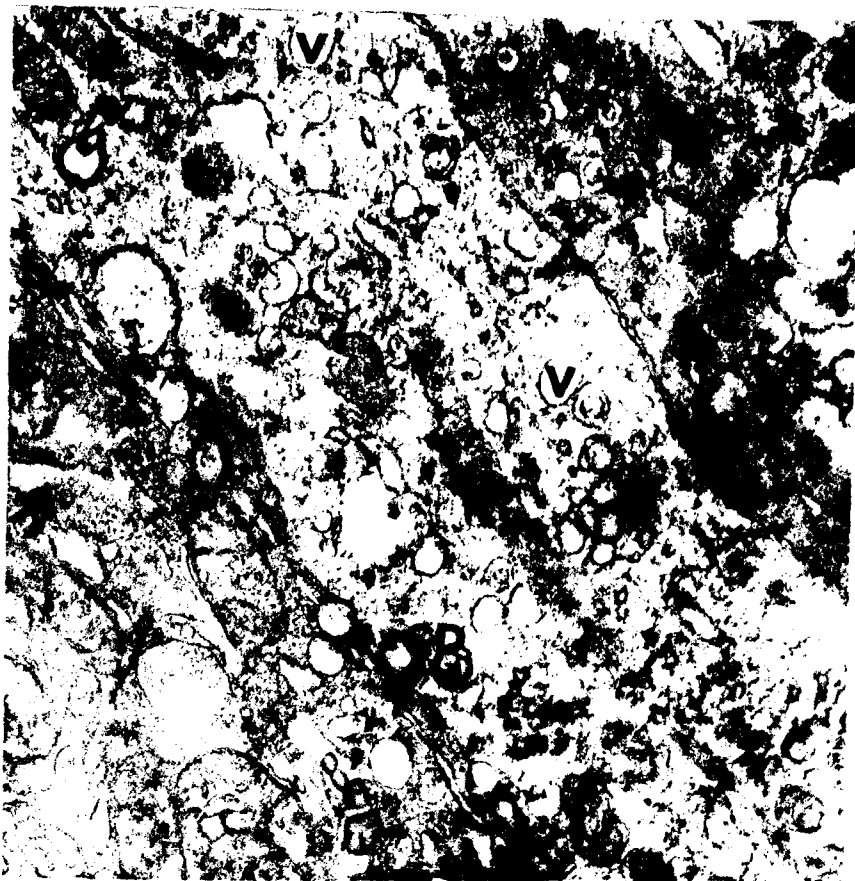


Fig. 5.2-29.- Porción apical de una célula clara rodeada por células oscuras (animal adulto). V: vacuolas. CD: cuerpos densos de probable origen lisosómico. 25.000x.

Fig. 5.2-30.- Porción apical de células intermedias y claras (animal adulto). A este nivel, las células gustativas aparecen unidas por desmosomas (flechas). 30.000x.

5.3.- NEOFORMACION PAPILAR Y REGENERACION DE LOS BOTONES GUSTATIVOS.

Animal: AD-248. Sexo: Hembra. Tamaño: 200 gr.

Experimento: Depapilación. Intervalo: 3 días.

Tinción: AChE.

Con un periodo de tiempo de supervivencia de 60 horas, observamos en este animal, únicamente tejido cicatricial en la superficie de la lengua donde ha estado localizada la papila central extirpada. Por debajo, solo hay unas pocas fibras nerviosas AChE positivas (Fig. 5.3-1).

Animal: AD-245. Sexo: Hembra. Tamaño: 200 gr.

Experimento: Depapilación. Intervalo: 3 días.

Tinción: AChE.

A las 72 horas de la depapilación, observamos que también en este animal existe una prominencia en la zona de la papila, pero con una forma más definida y que presenta, además, una estructura papilar anexa de forma triangular. El epitelio, aunque muy delgado, está reparado, no hay ya señales de la lesión, pero no aparecen en él señales del inicio de la formación de los botones. No hay fibras para inervar esta papila en formación, pero en zonas más profundas del conectivo encontramos haces gruesos de fibras, una de las ramas del glosofaríngeo, algunas neuronas sueltas y otras agrupadas en forma de ganglio (Figs. 5.3-2 y 3). Evidentemente la depapilación ha sido parcial.

Animal: AD-244. Sexo: Hembra. Tamaño: 200 gr.

Experimento: Depapilación. Intervalo: 3 días.

Tinción: AChE.

Hemos matado a este animal 84 horas después de la depapilación. Solo existe una pequeña prominencia en el lugar original de la papila y tampoco hay tejido epitelial organizado. En su lugar solo encontramos tejido cicatricial, evidentemente este animal aún no se ha recuperado de la lesión. Por supuesto no hay botones gustativos. En una región más profunda encontramos unas pocas fibras nerviosas muy delgadas y débilmente teñidas. La reacción de AChE no ha resultado positiva en ningún otro lugar del conectivo en regeneración.

Animal: AD-75. Sexo: Hembra. Tamaño: 200 gr.

Experimento: Depapilación. Intervalo: 5 días.

Tinción: AChE y ATPasa.

A los cinco días de una depapilación total, el animal muestra ya una papila neoformada. Los surcos de la papila aparecen abiertos y en su fondo desembocan conductos glandulares. El epitelio gustativo es muy grueso, formado por las capas celulares normales. En las superficies laterales y paredes del surco, el epitelio más superficial muestra tres o cuatro capas de células horizontales alargadas; son células con núcleo oscuro y citoplasma claro en preparaciones teñidas con azul de toluidina. El espacio intercelular es amplio. Las capas celulares basales son comple

tamente distintas de las superficiales. En este caso, las células son también alargadas pero en sentido vertical; su citoplasma es más basofílico y presenta inclusiones densas que dificultan la visualización del núcleo. Estos elementos forman un mosaico con muy escaso espacio intercelular. Las células basales son similares a otras diseminadas en el tejido conjuntivo que forma el eje de la papila y que, en algunas secciones, parecen penetrar en el epitelio (Fig. 5.3-4).

La reacción histoquímica de AChE permitió evidenciar la existencia de dos nervios delgados perpendiculares a la papila, que confluyen en el conjuntivo axial para formar un haz ascendente paralelo al eje de la papila. No se observaron fibras en contacto con el epitelio papilar (Fig. 5.3-5). Hay abundantes células cebadas en todo el conectivo axial, sobre todo rodeando a las estructuras AChE positivas.

La técnica histoquímica para ATPasa mostró que el epitelio de los surcos y paredes laterales de la papila no presenta botones ATPasa positivos.

Animal: AD-77. Sexo: Hembra. Tamaño: 200 gr.

Experimento: Depapilación. Intervalo: 6 días.

Tinción: AChE y ATPasa.

Este animal fue depapilado y sacrificado seis días después de la operación. Observamos una papila neoformada de pequeño tamaño, que no llega a sobresalir de la superficie lingual (Fig. 5.3-6). Los surcos son desiguales en

su forma e inervación. En el epitelio gustativo aparecen grupos de células formando estructuras semejantes a botones inmaduros, es decir, células fusiformes con núcleo central y citoplasma claro u oscuro. La base de estas estructuras aparece abierta hacia el tejido conjuntivo subepitelial. En el conectivo del eje papilar existen diseminadas y en gran cantidad, células similares a las que observamos en los botones en regeneración. Los cortes seriados mostraron que en el fondo de los surcos desembocan conductos glandulares normales.

La técnica histoquímica de AChE muestra una reacción bien definida pero asimétrica. Solamente se manifiesta alrededor del surco más profundo y en el eje de la papila. Hay muchas células cebadas alrededor de las fibras nerviosas teñidas por la reacción. Alrededor del surco existe una gran cantidad de fibras delgadas que se ramifican para formar una red. Todos los botones inmaduros se encuentran localizados en el epitelio de este surco (Figs. 5.3-7 y 8).

La reacción de ATPasa muestra las mismas características a nivel de las fibras nerviosas pero es negativa en los botones inmaduros.

Animal: AD-54. Sexo: Hembra. Tamaño: 300 gr.

Experimento: Depapilación. Intervalo: 13 días.

Tinción: AChE.

Este animal fue parcialmente depapilado y sacrificado a los trece días de la operación. En preparaciones te

ñidas para AChE, observamos la presencia de una papila normal. Su morfología y tamaño son los que corresponden a un animal adulto. Los dos surcos están abiertos y la papila sobresale de la superficie lingual.

El epitelio de las superficies laterales de la papila y el de las paredes del surco, presenta botones en número de 14 a 16 en las superficies laterales y de 10 y 11 en las paredes del surco. Estos botones son de la forma, tamaño y localización normal. Dentro de cada botón aparecen hasta 25 células, la mayoría de citoplasma claro y núcleo central. En algunos botones pueden observarse porciones de células convergiendo hacia el poro apical.

La reacción de AChE se manifestó positivamente alrededor de los surcos y en el eje de la papila. En la base de la papila existen haces de fibras perpendiculares a ella que confluyen hacia la parte basal del eje papilar y se continúan por un haz único y grueso que se dirige hacia la superficie apical. Rodeando estas fibras observamos una gran cantidad de células cebadas. Próximos a la base se observan algunos elementos neuronales correspondientes al ganglio papilar. Alrededor de los surcos aparecen fibras concéntricas unidas entre sí por fibras perpendiculares. Inmediatamente por debajo de los botones la reacción es más intensa, un festón AChE positivo demarca el polo basal de los botones. Algunas fibras nerviosas penetran en los botones llegando a la zona media (fibras intracorpúsculares), otras penetran en el epitelio intercorpúscular (Figs. 5.3-9 y 10).

Animal: AD-60. Sexo: Macho. Tamaño: 200 gr.

Experimento: Depapilación. Intervalo: 16 días.

Tinción: AChE y ATPasa.

A los 16 días de haber realizado la depapilación total, encontramos muy modificada la zona que corresponde a la papila. Aparecen aquí tres surcos bien profundos que dejan entre ellos dos elevaciones que corresponden a dos papilas de forma distinta. Una de ellas tiene las paredes rectas y en la parte apical se ensancha ligeramente para formar una meseta irregular; es la que más se parece a la papila normal. La otra papila acaba en un pico apical y tienen forma triangular. Las dos papilas son aproximadamente de la misma altura y diámetro (Figs. 5.3-11 y 12).

En cada uno de los surcos se abren conductos glandulares de forma normal.

Con la técnica histoquímica de AChE y contratinción con azul de toluidina, el epitelio aparece del grosor normal para un animal de esta edad. Los botones son grandes y numerosos, tienen una cápsula que los rodea y están formados por unas 30 células, cuyo citoplasma aparece débilmente teñido por la toluidina. Se observan poros gustativos normales (Fig. 5.3-13).

La tinción para AChE se manifiesta claramente positiva alrededor de los surcos y en los ejes de las papilas. Alrededor de los surcos la reacción es muy positiva, en seis capas de fibras nerviosas gruesas con delgadas conexiones perpendiculares. En la base de cada botón, la reacción es algo más intensa y se observan fibras intracorp-

culares de aspecto variable. En algunos botones se observa una fibra delgada, en otros las fibras son numerosas y pueden penetrar hasta la zona media. Entre los botones aparece una gran cantidad de fibras intercorpúsculares (Fig. 5.3-14). En el conjuntivo axial y basal de la papila se observan haces de fibras nerviosas similares a lo normal (Fig. 5.3-15). Alrededor de estas fibras hay gran cantidad de células cebadas.

La reacción para ATPasa nos muestra que las dos papilas neoformadas tienen botones ATPasa positivos. En una de las papilas se observan tres botones en el surco y dos en la superficie lateral externa. En la otra hay seis botones en la superficie lateral externa y siete en el surco.

Los botones son grandes, de forma típica, algo ovalados y formados por hasta 20 células pequeñas y alargadas (Fig. 5.3-16).

En las papilas y alrededor de los surcos, existen dos o tres fibras delgadas, paralelas y largas. El sistema de inervación de la papila es ATPasa positivo y muestra las características ya descritas (Fig. 5.3-12).

Animal: AD-126. Sexo: Hembra. Tamaño: 200 gr.

Experimento: Depapilación. Intervalo: 23 días.

Tinción: ATPasa.

A los 23 días de la depapilación de un animal adulto y siguiendo la técnica histoquímica de ATPasa, vemos una papila regenerada de tamaño y forma normal. La imagen que observamos es la misma que vemos en un animal adulto nor-

mal (Fig. 5.3-17).

En cortes transversales observamos los dos surcos abiertos y en el fondo de cada uno de ellos desembocan conductos glandulares normales.

El número de botones es grande, hasta 12 y 19 en las superficies laterales de la papila y 6 en las paredes del surco. Están formados por células de aspecto normal. Estas células se tiñen positivamente para la ATPasa (Fig. 5.3-18). Los nervios papilares son también teñidos y su aspecto en conjunto es igual a la imagen que vemos en los animales normales. Pudo observarse, por otra parte, la existencia de un ganglio papilar formado por neuronas y células gliales ATPasa positivas (Fig. 5.3-19).

Animal: AD-72. Sexo: Hembra. Tamaño: 200 gr.

Experimento: Depapilación. Intervalo: 72 días

Tinción: AChE y ATPasa.

En este animal con depapilación total, se observa una regeneración anormal a los 45 días de la operación. Aparecen otra vez tres surcos que delimitan dos papilas adyacentes (Figs. 5.3-20 y 21).

La técnica de AChE nos muestra una papila de forma normal pero algo más pequeña y otra triangular, ambas de la misma altura y grosor. El epitelio en los surcos es muy grueso y contiene botones. Prácticamente todos los botones se encuentran en el surco exterior de la papila triangular en número de 21 y faltan en el resto de la zona, excepto en la pared del otro surco exterior donde pueden

observarse tres o cuatro botones más. Todos tienen poros apical y basal. El epitelio de las zonas carentes de botones es grueso y bastante homogéneo.

La reacción para AChE es positiva en las superficies laterales y paredes de los surcos, pero no se manifiesta en absoluto alrededor del surco central carente de botones. Las fibras teñidas, en número de 4 ó 5, son paralelas entre sí y están unidas por conexiones perpendiculares. El sistema de inervación en el eje papilar es similar al normal pero no aparecen vestigios del ganglio papilar. La reacción para AChE es especialmente intensa. Se observan fibras intracorporales e intercorporales (Fig. 5.3-20). También hay haces de fibras perpendiculares al eje de la papila y vemos, como siempre, abundantes células cebadas rodeando a las fibras AChE positivas.

La técnica de ATPasa nos pone de manifiesto botones positivos en las dos papilas y en los surcos: dos y cinco en las superficies laterales de la papila triangular y hasta 14 en el surco; cuatro botones en la superficie lateral externa de la papila normal y 4 en su surco. Los botones son normales, tienen gran cantidad de células, hasta 40, que se tiñen positivamente. La reacción muestra también fibras nerviosas similares a las observadas en la tinción para AChE. En estas preparaciones tampoco pudo observarse la presencia del ganglio papilar (Fig. 5.3-21).



Fig. 5.3-1.- Papila en regeneración, 60 horas después de haber procedido a su extirpación. Animal AD-248. Coloración: AChE. La reacción ha resultado negativa en el conectivo papilar. 100x.



Fig. 5.3-2.- Animal parcialmente depapilado (AD-245), mostrando restos del sistema de innervación. Coloración: AChE. Flechas: Borde del epitelio reparado. G: rama del glosófaringeo. N: neuronas. 100x.

Fig. 5.3-3.- Detalle del ganglio del animal anterior. Coloración: AChE. 400x.





Fig. 5.3-4.- Corte transversal de una papila regenerada de 5 días (Animal AD-75). Coloración: AChE. El epitelio no presenta botones, pero hay ya fibras AChE positivas en la base de la papila (flecha). La imagen nos recuerda un animal de primera semana. 70x.



Fig. 5.3-5.- Surco de la papila del animal anterior mostrando claramente la ausencia de botones. Tampoco hay fibras AChE positivas intraepiteliales. Coloración: AChE. 200x.



Fig. 5.3-6.- Papila neoformada de la superficie lingual del animal AD-77, que fue sacrificado 6 días después de la extirpación papilar. Tinción: azul de toluidina. En el epitelio no hay botones. 80x.



Fig. 5.3-7.- Animal AD-77. Tinción: AChE-azul de toluidina. Los surcos son asimétricos y la reacción solo es positiva alrededor del surco más profundo. 70x.



Fig. 5.3-8.- Detalle del surco más profundo del animal anterior. No hay botones a pesar de que ya hay innervación. Tinción: AChE-azul de toluidina. 80x.

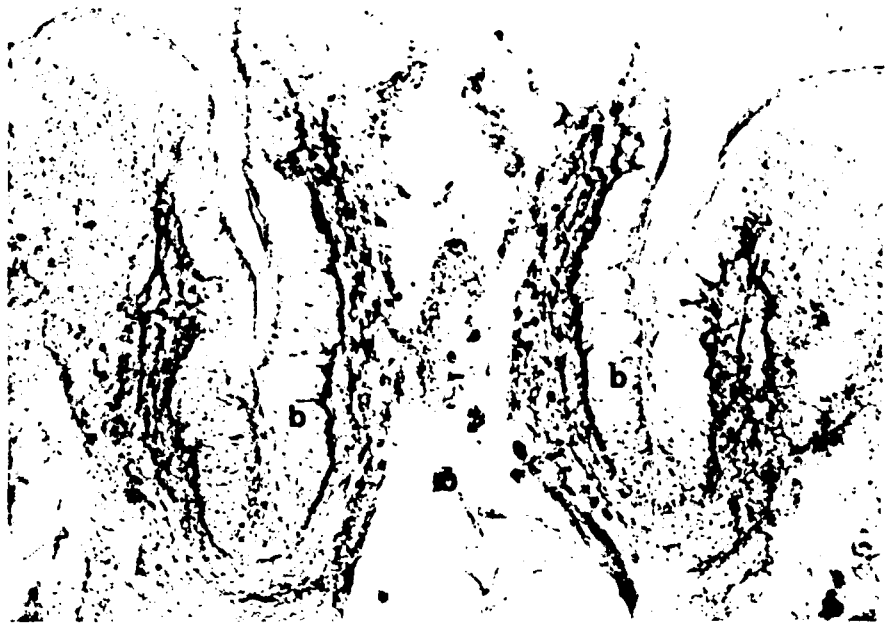


Fig. 5.3-9.- Corte transversal de una papila regenerada, 13 días después de la depapilación. Animal AD-54. Tinción: AChE-azul de toluidina. Tanto el sistema de inervación como los botones, incluidos en el epitelio, son completamente normales. B: botones gustativos. 100x.



Fig. 5.3-10.- El mismo animal con la misma técnica que el de la figura anterior, mostrando neuronas AChE positivas en la base de la papila(N). Flechas: fibras inter e intracorpusculares. 100x.



Fig. 5.3-11.- Regeneración anómala de una papila extirpada 16 días atrás. Animal AD-60. Tinción: AChE-azul de toluidina. Los tres surcos formados están inervados por fibras AChE positivas y presentan botones típicos en el epitelio. 100x.

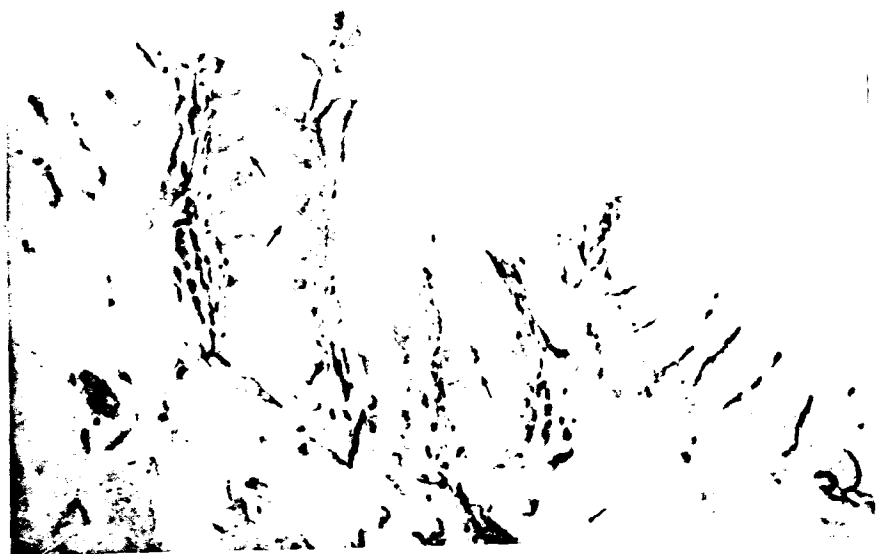


Fig. 5.3-12.- El mismo animal nos muestra las mismas características, pero con la técnica histoquímica de ATPasa. Las fibras de los tres surcos, y los botones son ATPasa positivos. Flechas: botones gustativos. 100x.



Fig. 5.3-13.- Detalle de dos botones del animal AD-60, para mostrar la entrada de fibras AChE positivas en su interior. Estos botones presentan poros de desembocadura al surco. Coloración: AChE-azul de toluidina. S: surco. P: poros. Flechas: fibras intracorpúsculares. 850x.

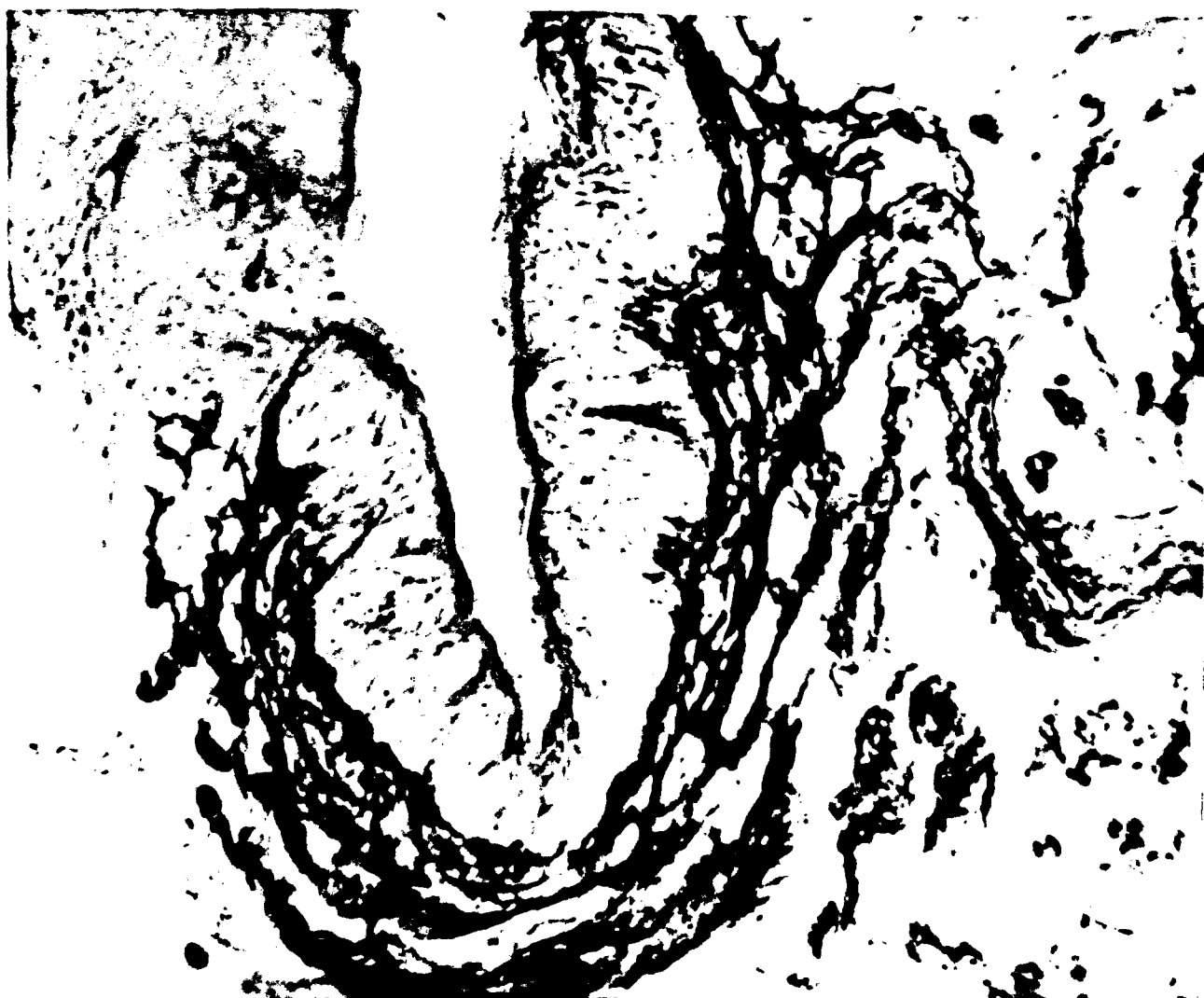


Fig. 5.3-14.- Surco de la papila regenerada del animal AD-60, mostrando una gran cantidad de fibras gruesas AChE positivas concéntricas, unidas por conexiones más delgadas, que penetran en el epitelio gustativo. 600x.



Fig. 5.3-15.- Animal AD-60. Parte basal de la papila, donde se encuentran localizados haces de fibras gruesos, tal como el que muestra la figura. Tinción: AChE-azul de toluidina. E: epitelio del fondo del surco. C: conectivo. 600x.

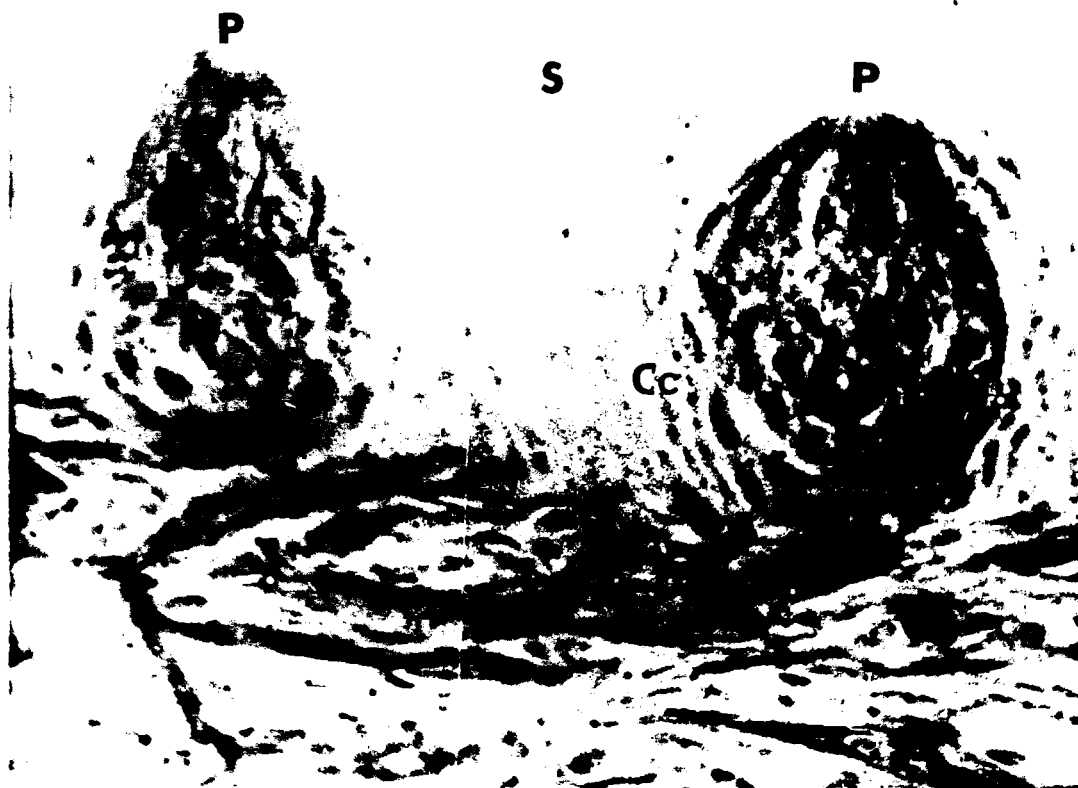


Fig. 5.3-16.- Detalle de los botones de la papila regenerada del animal AD-60. Tinción: ATPasa. Las células intracorpúsculares han resultado intensamente teñidas por la reacción, así como las fibras subgemaes. Las células capsulares (Cc) son negativas. S: surco circunvalar. P: poros. 850x.



Fig. 5.3-17.- Aspecto de una papila regenerada a los 23 días de la depapilación (animal AD-126). La inervación y el número de botones es normal. Tinción: ATPasa. 100x.



Fig. 5.3-18.- Detalle del surco papilar del animal anterior, mostrando botones en gran número, incluidos en el epitelio. Tinción: ATPasa. 300x.



Fig. 5.3-19.- Animal AD-126, parcialmente depigilado. Tinción: ATPasa. G: ganglio. F: fibras. 400x.



Fig. 5.3-20.- Corte transversal de una papila circunvalada, regenerada anormalmente 45 días después de la extirpación. Animal AD-72. Tinción: AChE-azul de toluidina. Flechas: surcos papilares. B: botones gustativos. 100x.

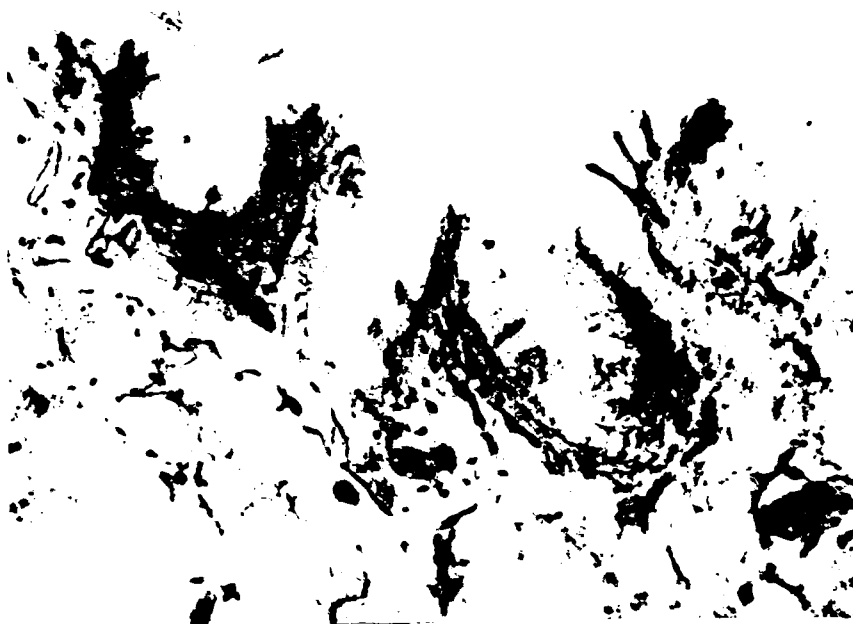


Fig. 5.3-21.- El mismo animal que el de la figura anterior, pero teñido con ATPasa, nos muestra también una regeneración anómala: dos papilas y tres surcos. Los botones se han agrupado preferentemente en una de las papilas. 100x.

5.4.- AUTOINJERTO PEDICULADO DE LA PAPILA EN LA SUPERFICIE DORSOLATERAL DE LA LENGUA.

Animal: AC-163. Sexo: Hembra. Tamaño: 200 gr.

Experimento: Autoinjerto pediculado de la papila.

Intervalo: 14 días. Tinción: Toluidina-bórax.

A los 14 días de haber procedido a desplazar la papila circunvalada central, lateralmente y hacia la derecha del sitio de implantación original, se observa que: a) se ha producido una regeneración anómala de una papila en el sitio primitivo. Se han formado cuatro papilas mucho más pequeñas que lo normal y todas del mismo tamaño y estructura. En el epitelio de estas papilas, aparecen botones en menor número que lo normal (Fig. 5.4-1). b) la papila injertada presenta signos de involución. Todavía aparece bien claro un surco en el que desemboca un conducto de glándula serosa y en el epitelio de este surco encontramos botones, aunque en pequeño número, que como media contienen, por corte y por botón, 3.5 células oscuras, 4.5 células intermedias y 1.75 células claras (Fig. 5.4-2).

En el epitelio de los surcos de las papilas regeneradas, aparecen botones, unos normales con poros apicales bien evidentes que van a desembocar al surco; otros botones son pequeños, formados por unas cuantas células oscuras y, finalmente, otros están algo desorganizados y abiertos al conjuntivo (Figs. 5.4-3 a 5). En los botones normales, las medias del número de células por corte y por botón, resultó ser de 9.75 células oscuras, 5.8 células in

termedias y 0.5 células claras.

Rodeando a los surcos hay fibras y células de Schwann, más profundamente se pueden ver fibras gruesas y tortuosas que se dirigen hacia la zona de la papila regenerada. Se observa también una formación que recuerda al ganglio papilar, constituida por fibras gruesas y neuronas.

Animal: AC-158. Sexo: Macho. Tamaño: 200 gr.

Experimento: Autoinjerto pediculado de la papila.

Intervalo: 14 días. Tinción: Toluidina-bórax.

Aún cuando el intervalo de tiempo en este experimento es igual al anterior, observamos, sin embargo, que la papila regenerada carece de botones gustativos. Este dato fue certificado en 1000 cortes seriados.

En el sitio de regeneración se han desarrollado dos papilas, una de forma completamente normal, pero más pequeña y con los surcos cerrados, y otra pegada a la primera y de forma triangular (Figs. 5.4-6 y 7). Incluido en el epitelio de la más grande, se observa un botón degenerado y algunas agrupaciones de células oscuras (Fig. 5.4-8). Por debajo, y pegadas al epitelio, encontramos fibras nerviosas. En una sola oportunidad observamos que un grupo de fibras penetra en el epitelio del surco y se conecta con un pequeño botón con poro basal abierto.

La papila injertada ha sufrido una gran involución. Pegadas al músculo y debajo de esta papila, aparecen glándulas, siendo las mucosas más numerosas que las serosas. El conjuntivo que forma el cuerpo de la papila aparece

reactivo e infiltrado. En el epitelio papilar no existen botones gustativos pero se observan algunas células claras y células de Schwann (Fig. 5.4-9). Por debajo del conectivo se ven fibras nerviosas de pasada entre el injerto y las papilas regeneradas, también hay neuronas sueltas, aunque no se localiza claramente ningún ganglio. Las fibras que existen debajo de las papilas regeneradas están organizadas, pero, en la zona del injerto, las fibras presentan una evidente desorganización y degeneración (Fig. 5.4-10).

Animal: AC-156. Sexo: Macho. Tamaño: 250 gr.

Experimento: Autoinjerto pediculado de la papila.

Intervalo: 30 días. Tinción: Toluidina-bórax.

Como era de esperar, en este intervalo de tiempo se ha producido una regeneración completa de la papila en el sitio original. La papila que se ha regenerado es más baja y ancha que lo normal, pero tiene los correspondientes surcos y glándulas anexas. En el epitelio aparecen botones en cantidad muy considerable aunque algo inferior a lo normal. Estos botones tienen poros apicales abiertos y están formados por los tipos celulares normales, aunque en menor cantidad y distinta proporción (por corte y por botón, las medias de los números de las células son: 1.1 cé^lulas claras, 2 células oscuras y 8.8 células intermedias) Sin embargo, uno de los lados del surco carece de botones. (Figs. 5.4-11 y 12).

Al lado del surco sin botones, aparecen pegadas dos

pequeñas papilas de forma triangular; son tan estrechas que están formadas prácticamente por tejido epitelial y un eje conectivo muy delgado (Fig. 5.4-13). En estas formaciones hemos observado un solo botón normal y uno o dos botones desorganizados (Fig. 5.4-14). Debajo de la papila regenerada hay inervación normal con fibras enteras cortadas longitudinal o transversalmente; por la parte contraria a donde está el injerto, avanza una de las ramas gruesas del glossofaríngeo hacia la primitiva región del ganglio, aunque éste no está presente en esta papila regenerada (Figs. 5.4-15 y 16).

La papila injertada ha perdido sus surcos; en ella localizamos unos pocos botones esporádicos y por debajo del epitelio, numerosas fibras nerviosas degenerativas (Fig. 5.4-17).

Animal: AC-91. Sexo: Hembra. Tamaño: 250 gr.

Experimento: Autoinjerto pediculado de la papila.

Intervalo: 40 días. Tinción: Toluidina-bórax.

A los 23 días de haber operado a este animal, le fue examinada la lengua con una lupa, lo que permitió ver que se había regenerado una papila pequeña y que la papila injertada se mantenía en su sitio. El examen microscópico de las preparaciones, nos mostró una papila regenerada de forma normal y una papila regenerada incompleta.

La papila regenerada presenta botones normales y numerosos, formados por células claras, oscuras e intermedias en las siguientes proporciones: 1.2 células claras,

8.6 células oscuras y 7.3 células intermedias (número me dio por corte y por botón); también hay algún botón en formación (Fig. 5.4-18). Sin embargo, los botones están agrupados, casi exclusivamente, en uno de los lados del surco. En el otro solo aparecen uno o dos y a intervalos espaciados (Fig. 5.4-19). Vemos, además, un aumento del número de acinos y conductos glandulares, algunos de ellos suben por los lados del surco donde están los bot ones. La inervación de la papila es normal, aparecen fibras gruesas en la base de los surcos y, de menor grosor, en el resto de la zona, pero no hay ninguna estructura que podamos identificar con el ganglio (Fig. 5.4-20).

La papila injertada presenta una forma extraña: son como dos papilas, una con la base pegada al surco de la otra (Fig. 5.4-21). Los epitelios de ambas papilas son normales; en el de la pegada aparecen dos o tres botones pequeños formados por células claras e intermedias y en la otra hay botones más numerosos, con una mayoría de células claras en su interior y casi todos con poro apical desembocando en el surco (Fig. 5.4-22). En la base de las papilas hay acinos glandulares de tipo seroso e, inmediatamente por debajo de ellos, aparecen glándulas mucosas. Las fibras nerviosas de la zona presentan desor ganización, pero no se ve una degeneración clara (Fig. 5.4-23).

Animal: AC-183. Sexo: Hembra. Tamaño: 224 gr.

Experimento: Autoinjerto pediculado de la papila.

Intervalo: 60 días. Tinción: Toluidina-bórax.

En este animal, hemos dejado transcurrir dos meses después de la operación para lograr, por una parte, una máxima regeneración y por otra, una evolución prolongada de la papila injertada. Hemos podido localizar tanto la papila regenerada como la injertada, en preparaciones de la lengua cortadas sagitalmente.

La papila regenerada presenta un tamaño y forma normales, y otras dos formaciones semejantes a la papila, pero más estrechas y pequeñas, como suele ocurrir en todas las papilas regeneradas. Estas dos papilas accesorias tienen el epitelio normal, pero no presentan botones (Fig. 5.4-24). En cambio, en la papila grande aparecen muchos botones y la inmensa mayoría de ellos son normales de forma (Figs. 5.4-25 y 26). Haciendo un recuento del número de sus células, vemos que como media tenemos: 0.4 células claras, 5.4 células oscuras y 5.6 células intermedias. Las fibras de inervación son normales.

La papila injertada presenta características atípicas, sobre todo por las alteraciones del conectivo subpapilar que todavía contiene fibras nerviosas degenerativas (Fig. 5.4-27), y por la enorme cantidad de estructuras glandulares serosas cuyos conductos, algunos muy largos y estrechos, son perpendiculares a la superficie de la papila (Fig. 5.4-28). Un poco por fuera de la zona hay glándulas mucosas. Aunque el epitelio papilar es normal, no encontramos ningún botón en toda esta papila. En el eje papilar hay fibras normales y degenerativas que se orientan

en forma paralela a la superficie (Fig. 5.4-29). No se ha podido localizar la estructura del ganglio, pero entre los acinos hay neuronas sueltas completamente normales.

Animal: AC-235. Sexo: Hembra. Tamaño: 250 gr.

Experimento: Autoinjerto pediculado de la papila.

Intervalo: 15 días. Tinción: Toluidina-bórax.

El examen de las preparaciones de la lengua de este animal, nos muestran una regeneración de la papila extirpada y una implantación del injerto. La papila regenerada es normal de forma y tamaño, aunque algo más baja y acompañada de algunas otras formaciones pequeñas de forma semejante a la papila (Fig. 5.4-30). En uno de los surcos de la papila desemboca un conducto seroso y en el epitelio de ese surco aparecen los botones en muy pequeña cantidad, solo unos 6 a 10 con pocas células, 10 ó 12; células claras hay muy pocas y la cantidad de células intermedias y oscuras es, aproximadamente, la misma. También hay 5 ó 6 pequeños botones de estructura primitiva (Fig. 5.4-31). Sin embargo, en el otro surco no aparecieron botones típicos. La inervación es normal, hay muchos nervios y bien gruesos, pero en algunos puntos se presenta algo de degeneración.

La papila injertada ha quedado como una prominencia pequeña al lado de la regenerada (Fig. 5.4-32), presenta epitelio normal, en el que no aparecen botones, salvo restos de tres, y células claras e intermedias sueltas en el epitelio (Figs. 5.4-33 y 34). Las fibras nerviosas están

orientadas paralelas a la superficie libre de la papila
y van de la regenerada al injerto.

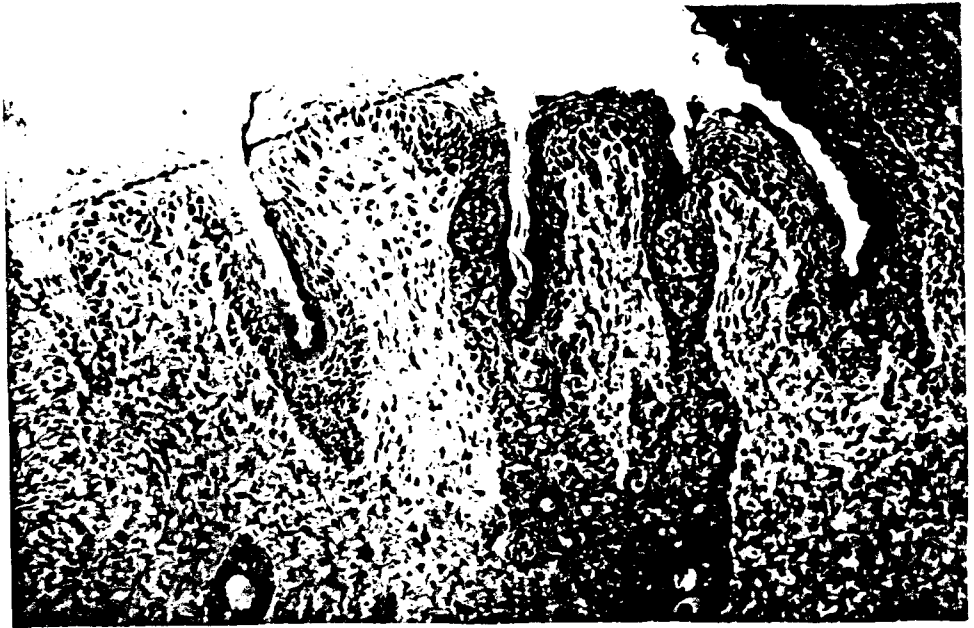
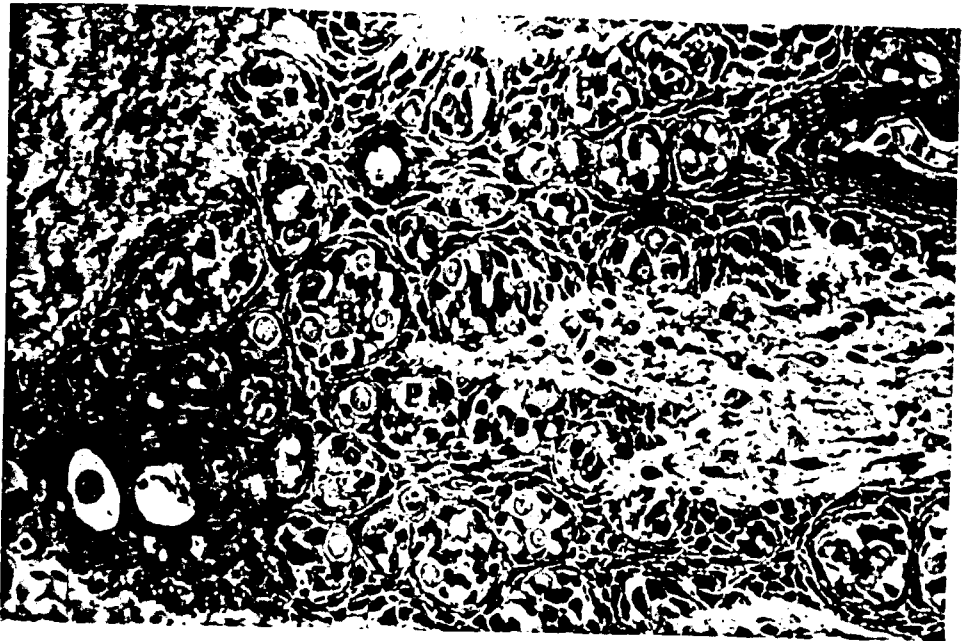
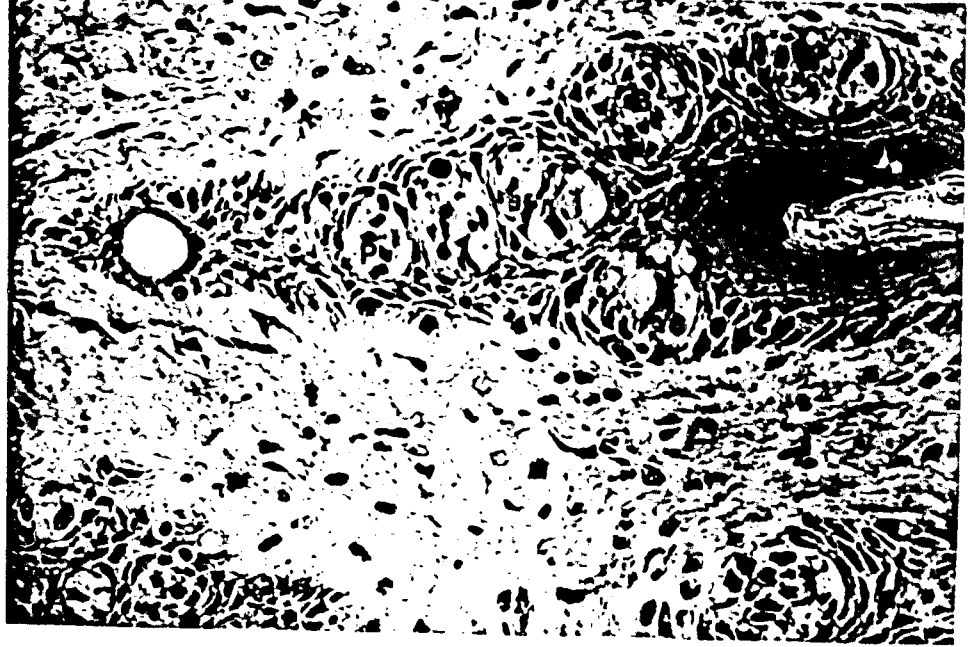


Fig. 5.4-1.- Papilas regeneradas 14 días después de haber trasladado la papila original a la derecha de la superficie dorsal. Animal AC-163. Inclusión: Epón. Coloración: toluidina-bórax. Los botones se agrupan preferentemente en algunos "surcos". 150x.



Fig. 5.4-2.- Papila injertada del animal anterior (AC-163). Todavía se ve un surco con algún botón (flechas). 150x.



Figs. 5.4-3 a 5.- Tres aspectos del epitelio gustativo de las papilas regeneradas del animal AC-163, mostrando botones gustativos normales (B), otros pequeños (P) y algunos abiertos al conectivo (C). Casi todos presentan mayoría de células oscuras. 200x.



Fig. 5.4-6.- Regeneración de una papila transplantada. Animal AC-158. A los 14 días de la operación no hay botones en el epitelio gustativo. Inclusión: Epón. Coloración: toluidina-bórax. 150x.



Fig 5.4-7.- Papila regenerada adyacente a la de la figura anterior. Los surcos están cerrados y no hay botones en el epitelio. 150x.

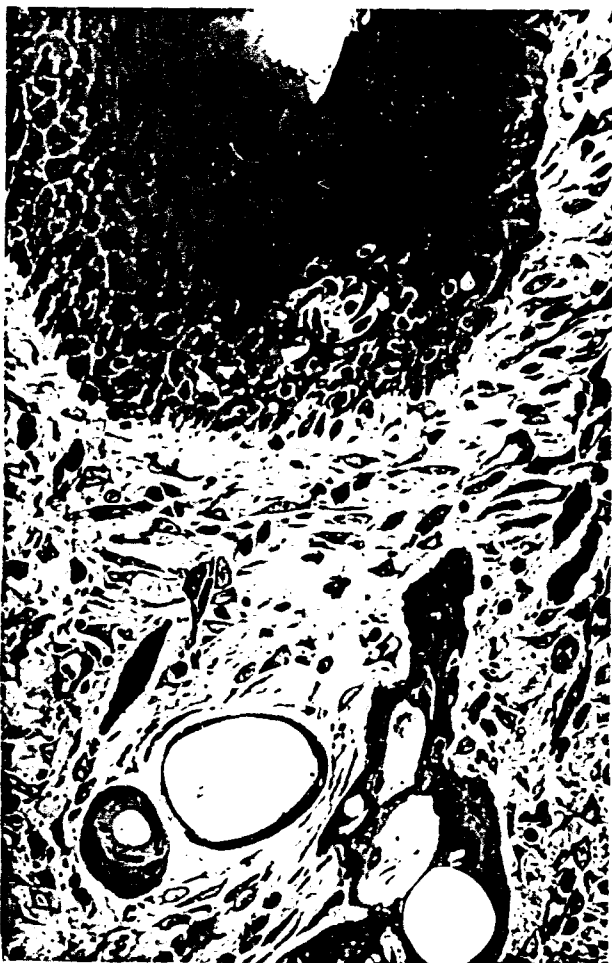


Fig. 5.4-8.- Botón en el epitelio de la papila regenerada. Animal AC-158. 200x.

Fig. 5.4-9.- Papila transplantada que mantiene la forma, aunque los botones han desaparecido del epitelio. Animal AC-158. 100x.



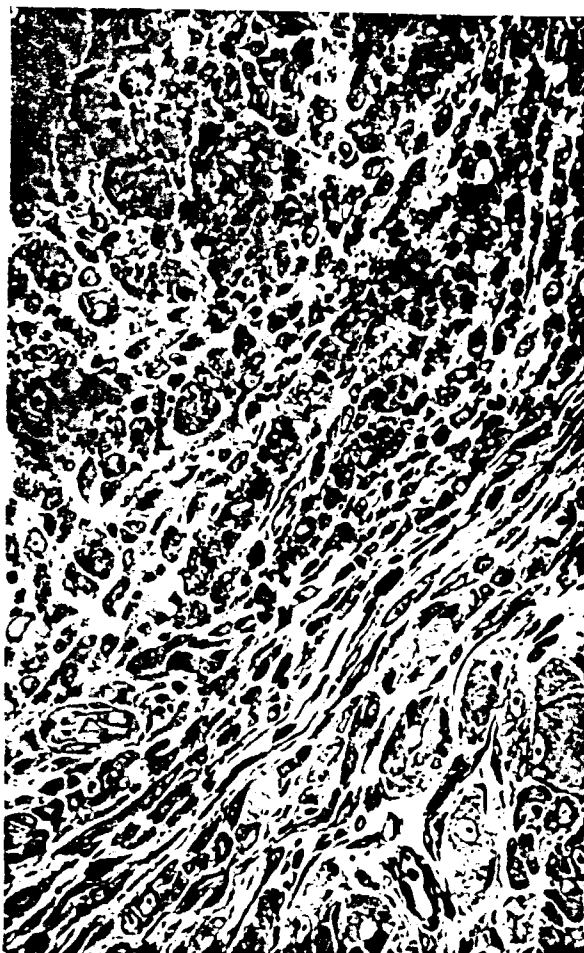
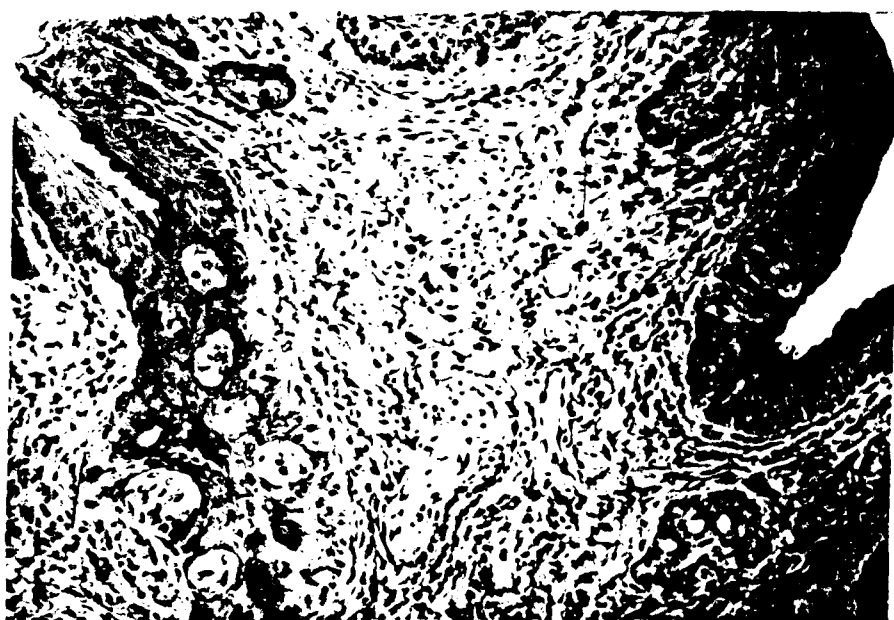
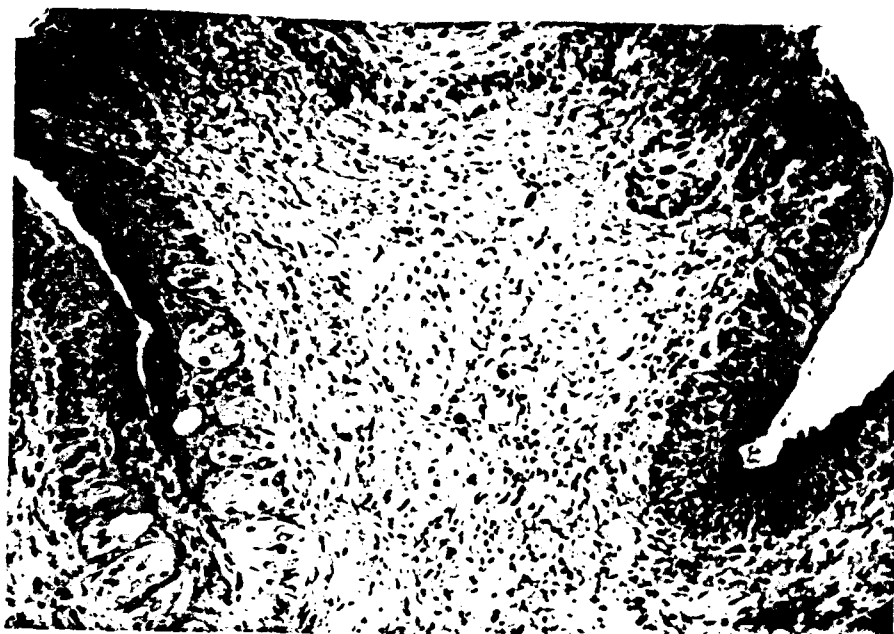


Fig. 5.4-10.- Tejido conectivo de la papila injertada del animal anterior, mostrando degeneración de las fibras nerviosas. 400x.



Figs. 5.4-11 y 12.- Dos cortes transversales de la papila regenerada del animal AC-156. La mayoría de los botones gustativos aparecen en uno de los lados del surco. Inclusión: Epón. Coloración: toluidina-bórax. 100x.



Fig. 5.4-13.- Papilas re-
generadas de forma atí-
pica. Animal AC-156. Tam-
poco existen botones en
el epitelio. 100x.

Fig. 5.4-14.- Zona de
transición entre la pa-
pila regenerada y la
injertada del animal
AC-156. 100x.



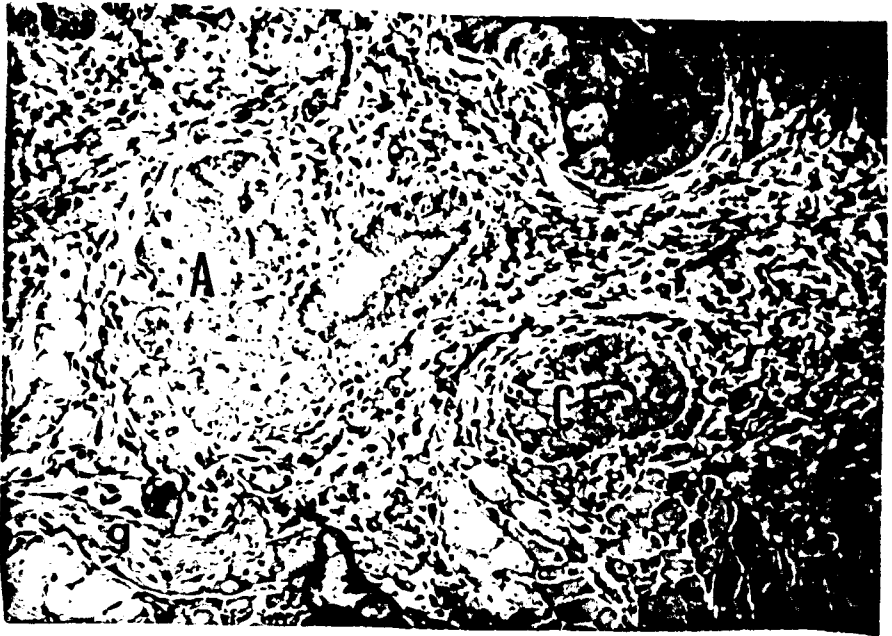


Fig. 5.4-15.- Conectivo subpapilar de la papila regenerada del animal AC-156. S: fondo del surco con botones. G: rama del glossofaríngeo. A: acinos glandulares serosos. CE: conducto excretor. 300x

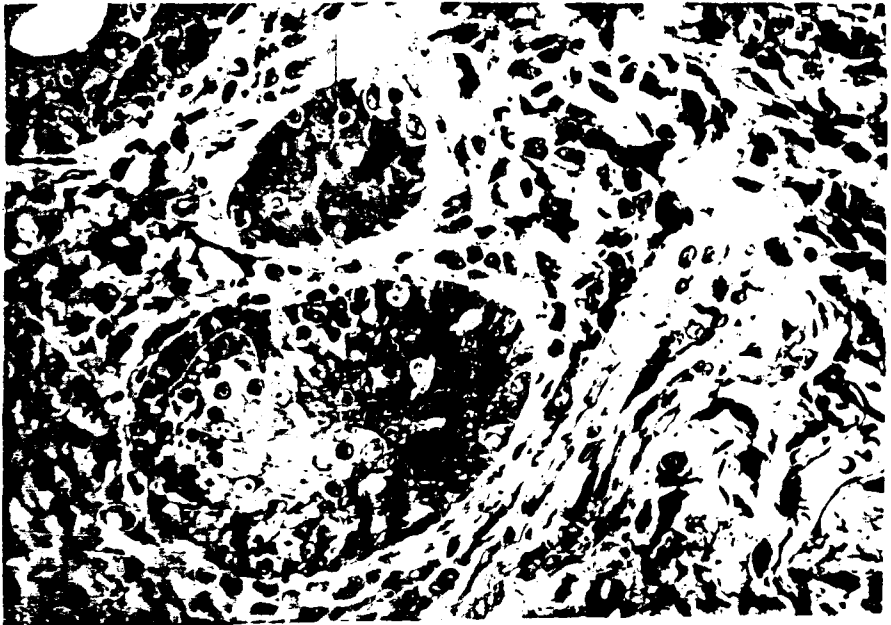


Fig. 5.4-16.- Detalle del tejido conectivo de la papila regenerada del animal AC-156, mostrando que el sistema de innervación es normal. 400x.



Fig. 5.4-17.- Papila injertada en corte transversal, del animal AC-156. Inclusión: Epón. Coloración: toluidina-bórax. Solo hay unos pocos botones en degeneración en toda la papila. 100x.

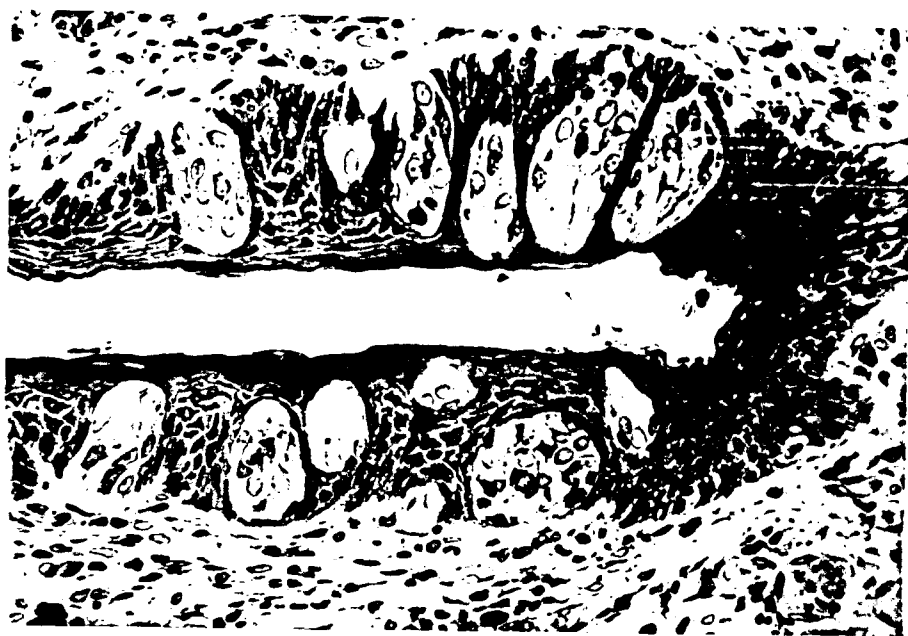


Fig. 5.4-18.- Surco de una papila regenerada, 40 días después de su extirpación (Animal AC-91). Los botones son de aspecto normal. Inclusión: Epón. Coloración: toluidina-bórax. 200x.



Fig. 5.4-19.- Los botones que se muestran en la figura anterior están agrupados en solo uno de los surcos de la papila regenerada del animal AC-91. 100x.

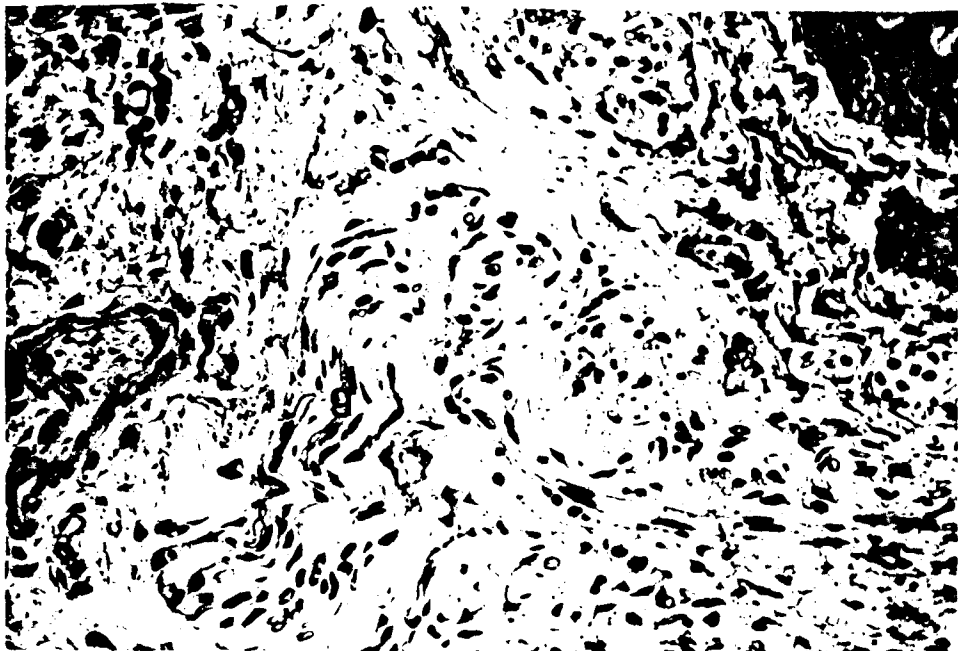


Fig. 5.4-20.- Inervación de la papila regenerada. Animal AC-91. S: fondo del surco que contiene a los botones. G: rama del glossofaríngeo. 300x.

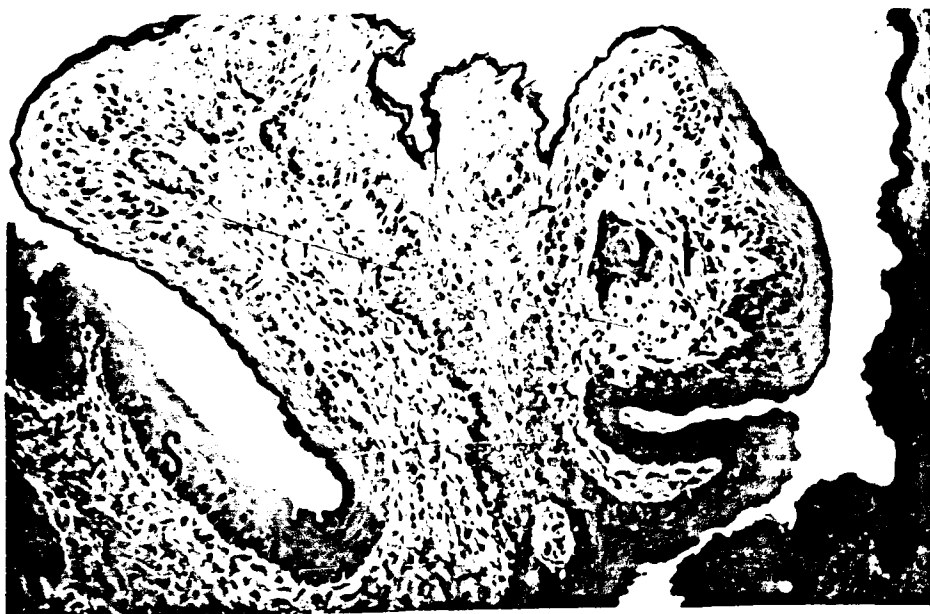


Fig. 5.4-21.- Papila injertada (I). Animal AC-91. S: surco sin botones de la papila regenerada. 100x.



Fig. 5.4-22.- Botones gustativos (B) en la papila injertada. Animal AC-91. 200x.

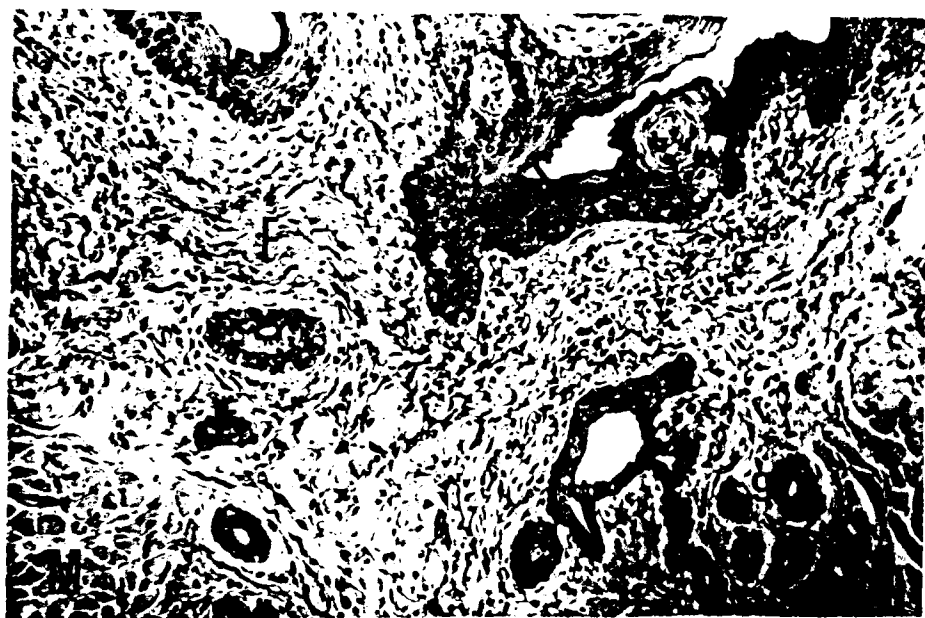


Fig. 5.4-23.- Tercio basal de la papila injertada del animal AC-91. S: surco. G: acinos glandulares. F: fibras del conectivo. M: células musculares. 200x.



Fig. 5.4-24.- Papila regenerada del animal AC-183, a los dos meses de la operación. Inclusión: Epón. Coloración: toluidina-bórax. 150x.



Fig. 5.4-25.- Papila regenerada con botones, del animal anterior. 100x.



Fig. 5.4-26.- Botones de apariencia normal en el epitelio gustativo de la papila regenerada del animal AC-183. In-clusión: Epón. Coloración: toluidina-bórax. 200x.

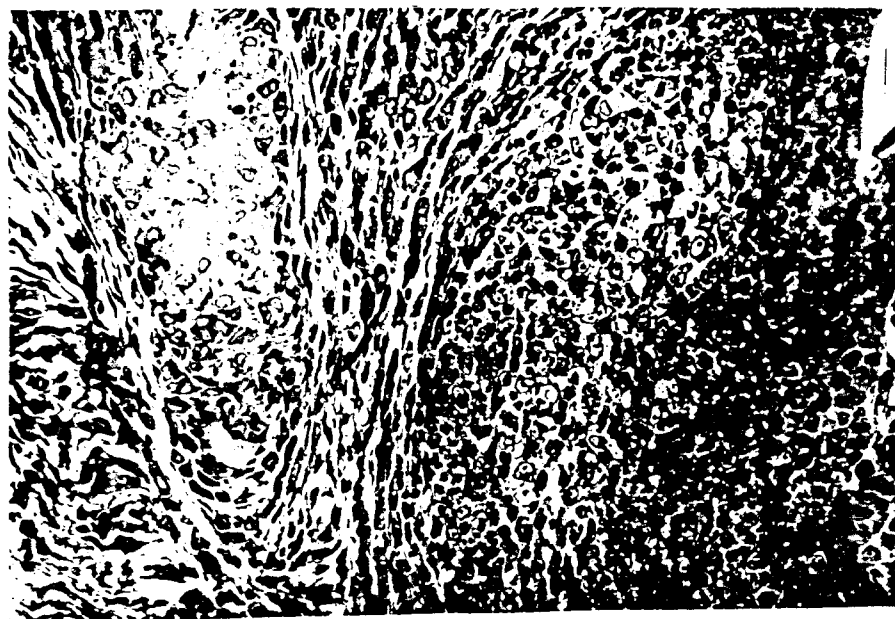


Fig. 5.4-27.- Conectivo subpapilar de una papila injerta da, mostrando la degeneración que han sufrido las fibras nerviosas y las glándulas serosas. Animal AC-183. 400x.



Figs. 5.4-28 y 29.- Dos aspectos de la papila injertada del animal AC-183. Nótese la ausencia de botones en el epitelio y la gran cantidad de conductos glandulares perpendiculares a la superficie de la papila. 100x.



Fig. 5.4-30.- Corte transversal de una papila regenerada a los 15 días de su extirpación. Animal AC-235. Inclusión: Epón. Coloración: toluidina-bórax. Solamente hay botones en uno de los lados del surco. 100x.



Fig. 5.4-31.- Los botones presentes en la papila regenerada son de menor tamaño que los de los animales controles. 200x.



Fig. 5.4-32.- Papila injertada del animal AC-235. Inclusión: Epón. Coloración: toluidina-bórax. El tejido conectivo cicatricial del eje papilar es muy denso. CE: conducto excretor seroso. 100x.



Fig. 5.4-33.- Aspecto del epitelio gustativo de la papila injertada. Animal AC-235. Solo hay restos de botones. 200x.



Fig. 5.4-34.- Dos botones remanentes de la papila injertada del animal AC-235. 400x.

5.5.- EFECTO DE LA COLCHICINA SOBRE LA DIFERENCIACION DE LOS BOTONES GUSTATIVOS.

Animales controles

Los animales que fueron tratados con el vehículo de la colchicina (solución salina), inyectados por una vez o por dos veces consecutivas y con intervalo de cinco días, mostraron al 5º día posterior a la última inyección, las siguientes características:

- a) botones gustativos normales en número, estructura y reactividad a las técnicas para AChE y ATPasa.
- b) sistema de innervación igualmente normal.

Animales experimentales

1º) Inyección única de colchicina por debajo del epitelio de la superficie libre de la papila:

Animal: ACol-80. Sexo: Hembra. Tamaño: 180 gr.

Experimento: Inyección de colchicina en la superficie libre de la papila.

Intervalo: 6 días. Tinción: AChE.

-AChE: La reacción AChE positiva aparece localizada a nivel del sistema de innervación de la mitad inferior de la papila (Fig. 5.5-1). Llama la atención, en este animal, la intensa reacción observada a nivel de las neuronas del ganglio papilar (Fig. 5.5-2). El citoplasma de estas células aparece homogéneamente teñido y los núcleos pueden

ser localizados por su menor densidad. A nivel del plexo subepitelial de la papila y del surco, se observa una franca reducción en el número de fibras AChE positivas (Fig 5.5-3). Por debajo del epitelio gustativo se observa un estrato intensamente positivo del cual parten fibras intracorpúsculares. Hay 87 botones en 11 cortes.

Animal: ACol-56. Sexo: Macho. Tamaño: 300 gr.

Experimento: Inyección de colchicina en la superficie libre de la papila.

Intervalo: 11 días. Tinción: AChE.

-AChE: En este animal se observó que los plexos subepiteliales presentan una reacción normal en intensidad, número de fibras positivas y diámetro de las mismas (Fig. 5.5-4). Las únicas alteraciones observadas en estas preparaciones fueron:

a) ausencia de fibras AChE positivas a nivel del conectivo de la cúpula papilar (Fig 5.5-5) y

b) aumento marcado de la intensidad de la reacción a nivel del citoplasma de las neuronas del ganglio papilar (Fig. 5.5-6).

Los botones gustativos, claramente identificables, presentaron aspecto y número normal (109 botones en cuatro cortes).

Animal: ACol-42. Sexo: Hembra. Tamaño: 260 gr.

Experimento: Inyección de colchicina en la superficie libre de la papila.

Intervalo: 12 días.

Tinción: ATPasa y AChE.

En este animal, sacrificado 12 días después de la inyección de colchicina en la superficie papilar, observamos las alteraciones que describimos a continuación:

-ATPasa: La reacción para ATPasa fue intensamente positiva a nivel del sistema de inervación de toda la papila. Las raíces del nervio papilar, el ganglio, el nervio papilar y los plexos subepiteliales de la papila y del surco, quedaron perfectamente delimitados por la reacción (Fig. 5.5-7). Observando estas preparaciones con aumentos apropiados, se verificó que los elementos más intensamente teñidos son las células de Schwann que rodean a las fibras nerviosas. Por encima del epitelio gustativo se observaron filetes nerviosos con reacción positiva, los cuales llegan a hacer contacto con el epitelio de la superficie libre de la papila. Como en otros casos, los vasos sanguíneos dieron también reacción positiva.

En el epitelio gustativo, el número y localización de los botones parece normal (123 botones en 6 cortes). Las células gustativas son intensamente positivas. Algunos botones presentan espacios claros que son atribuidos a artefactos de preparación (Fig. 5.5-8).

-AChE: La reacción para AChE se manifestó, como de costumbre, a nivel del sistema de inervación papilar. Llama la atención, sin embargo, que en estas preparaciones no aparecieron, o bien fueron muy escasas, las fibras AChE positivas de la mitad superior de la papila (porción

no gustativa). La reacción a nivel de las fibras nerviosas de los plexos subepiteliales, es menos intensa que en los animales control. Esto es debido a que las fibras en la papila colchicinizada aparecen más delgadas que lo normal (Fig. 5.5-9). Alrededor de las estructuras AChE positivas aparecen escasas células cebadas. En cuanto a los botones gustativos, éstos resultaron normales en número y estructura (52 botones en 3 cortes).

En resumen, a pesar de la diferencia de intervalo entre la inyección y el momento de sacrificar al animal, se observó:

- a) todos los animales presentaron pérdida de la reacción de AChE de las fibras pegadas a la superficie de la papila (lugar de la inyección).
- b) disminución de las fibras que inervan el epitelio gustativo de la pared papilar y del surco.
- c) no hay disminución del tamaño y forma de los botones.
- d) reacción de ATPasa intensa tanto en los botones como en el sistema de inervación papilar incluyendo las fibras de la superficie libre de la papila.

2º) Inyección única de colchicina por debajo del epitelio, en la parte anterior del surco papilar:

Animal: ACol-87. Sexo: Hembra. Tamaño: 200 gr.

Experimento: Inyección de colchicina en la parte anterior del surco papilar.

Intervalo: 10 días. Tinción: AChE y ATPasa.

-ATPasa: La reacción de ATPasa en el sistema de inervación fue similar a lo obtenido en el animal anterior (ACol-42) en lo referente a distribución, pero menor en intensidad. La reacción fue negativa o apenas detectable a nivel de los botones gustativos (Fig. 5.5-10).

-AChE: La tinción para AChE recuerda en este animal, a lo observado en el animal ACol-42. Hemos contado 159 botones en 8 cortes (Figs. 5.5-11 a 13).

3º) Inyección única de colchicina en la región subpapilar.

Animal: ACol.-81. Sexo: Hembra. Tamaño: 200 gr.

Experimento: Inyección de colchicina subpapilar.

Intervalo: 12 días. Tinción: AChE y ATPasa.

-ATPasa: La reacción para ATPasa dió resultados similares a los descritos para animales anteriores (ACol-42, ACol-87), botones y fibras nerviosas positivos.

- AChE: El número de fibras nerviosas AChE positivas resultó en este animal, muy inferior al de los correspondientes controles. El plexo subepitelial a nivel del surco apareció más voluminoso que a nivel de la papila. La Fig. 5.5-14 muestra escasísimas fibras a nivel de la mitad inferior de la papila. Se pudieron contar 117 botones en 8 cortes.

4º) Doble inyección de colchicina con intervalo de cinco días:

A) Animales matados a los dos días:

Animal: ACol-215. Sexo: Hembra. Tamaño: 200 gr.

Experimento: Dos inyecciones de colchicina en la papilla, con intervalo de 5 días cada una. Se sacrificó dos días después de la segunda inyección.

Tinción: Toluidina-bórax. Inclusión: Epón.

Con dos días de intervalo de tiempo entre la segunda inyección de colchicina y la muerte del animal, observamos, en cortes sagitales de una micra, que los botones no han desaparecido por completo (Figs. 5.5-15 y 16). Sin embargo, han disminuído mucho en número, solo contamos unos 15 en 100 cortes seriados. También han disminuído en cuanto a su tamaño y al número de sus células. De estos pocos botones, algunos solo contienen células intermedias y no presentan cápsula; otros están formados solo por unas cuantas células claras y, por último, los menos modificados aparecen formados por 10 ó 12 células claras e intermedias a las que pueden sumarse 1 ó 2 células oscuras (Figs. 5.5-17 y 18). Hay muy pocos signos de degeneración de los botones o de las fibras nerviosas que los inervan.

Animal: ACol-221. Sexo: Hembra. Tamaño: 200 gr.

Experimento: Dos inyecciones de colchicina en la papilla, con intervalo de 5 días cada una. Se sacrificó dos días después de la segunda inyección.

Tinción: Toluidina-bórax.

Inclusión: Epón.

Repitiendo las condiciones experimentales realizadas en el animal anterior, las preparaciones obtenidas muestran unos resultados parecidos. El número de botones ha disminuído (Figs. 5.5-19 y 20). Contamos unos 50 en 160 cortes seriados. Estos botones son, salvo unas pocas excepciones, normales de forma y tamaño. La única modificación que notamos es un aumento del número de células claras, mientras que el número de células oscuras es muy reducido (Figs. 5.5-21 y 22). Las excepciones que mencionamos antes son: células claras sueltas, botones pequeños con células desorganizadas, algún botón sin cápsula y agrupaciones de células que no forman botones propiamente dichos (Figs. 5.5-21 a 23). El sistema de inervación es normal.

En conclusión, ambos animales presentan una disminución en el número de botones y uno de ellos signos de degeneración en el sistema papilar.

B) Animal matado a los cuatro días:

Animal: ACol-214.

Sexo: Hembra.

Tamaño: 200 gr.

Experimento: Dos inyecciones de colchicina en la papila, con intervalo de cinco días cada una. Se ha sacrificado cuatro días después de la segunda inyección.

Tinción: Toluidina-bórax.

Inclusión: Epón.

El epitelio gustativo de la papila de este animal, aparece completamente ocupado por los botones gustativos, de forma y tamaño normal (Fig. 5.5-24). Sin embargo, observamos una diferencia entre estos botones y los normales: el número de células claras ha aumentado considerablemente. Además, su núcleo ha aumentado de tamaño, las células son más voluminosas que lo normal y mucho más acuosas. En un conteo preliminar, las medias del número de células, por corte y por botón, nos da una proporción de dos claras, una oscura y dos intermedias. A veces, no hay botón sino grupos de dos o tres células muy claras juntas y, dentro del botón, también las células claras es tán agrupadas.

El núcleo de estas células claras, que ya dijimos que era muy grande, tiene forma bien redonda o, excepcio nalmente, alargada; posee dos o tres nucleolos que pueden ser centrales o periféricos y la cromatina está regularmente dispuesta. Este núcleo está situado en el centro del citoplasma. El citoplasma tiene granulaciones que se acumulan alrededor del núcleo formando un huso y se alar ga, en muchos casos, hasta el poro del botón; en la par te que está mas cerca de la superficie, el número de gra nulaciones aumenta o aparece una formación muy densa y bastante grande, pegada al núcleo. El resto del citoplas ma es muy claro y sin granulaciones (Fig. 5.5-28).

Las células intermedias y oscuras son completamente normales.

En resumen, no se observaron en este animal altera-

ciones cualitativas de los botones, pero éstos contienen células del tipo claro, más voluminosas y numerosas que lo normal.

C) Animales matados a los cinco días:

Animal: ACol-204. Sexo: Hembra. Tamaño: 200 gr.

Experimento: Dos inyecciones de colchicina en la papila, con intervalo de cinco días cada una. Se ha sacrificado cinco días después de la segunda inyección.

Tinción: ATPasa y AChE.

-ATPasa: La reacción nos muestra una papila de forma normal así como de tamaño, pero lo que nos llama la atención es que los botones gustativos han desaparecido por completo (Fig. 5.5-29). El epitelio aparece formado por células pequeñas, redondeadas, de núcleo central, separadas unas de otras por espacios intercelulares, y son todas muy iguales; no aparecen formaciones que recuerden células gustativas procedentes de un botón en degeneración, ni ningún tipo de células con reacción ATPasa positiva. La reacción se manifiesta, en cambio, normal para las fibras del eje papilar y las que rodean a los surcos, así como a las células de Schwann que acompañan a estas fibras. El ganglio aparece muy grade, formado por muchas células de Schwann que tienen reacción ATPasa positiva normal y en él desembocan los haces de fibras que vienen perpendiculares al eje de la papila (Fig. 5.5-30).

-AChE: Las preparaciones de este mismo animal que han sido teñidas con la reacción de AChE, nos muestran también que no existe ningún tipo de botón, ni ningún tipo de formación que lo recuerde, en el epitelio de la papila (Fig. 5.5-31). Las células epiteliales que forman el surco de la papila, son iguales a las de su superficie libre, donde nunca las hemos observado con esta técnica. Son células redondeadas u ovaladas, grandes, débilmente teñidas de azul por la toluidina y de núcleo no visible; están adosadas unas a otras sin dejar espacios entre ellas. La reacción ha resultado algo menor que lo normal, en intensidad, pero no en extensión; muchas fibras, aunque delgadas, llegan hasta la superficie de la papila sin entrar en el epitelio. Al igual que en los controles, las fibras penetran en el epitelio de las superficies papilares laterales aunque no existan botones. Se observa un buen número de fibras en la base de la papila, alrededor del ganglio y también en el eje papilar (Figs. 5.5-32 y 33). El ganglio aparece formado por una serie de neuronas prominentes.

Animal: ACol-213. Sexo: Hembra. Tamaño: 200 gr.

Experimento: Dos inyecciones de colchicina en la papila, con intervalo de cinco días cada una. Se sacrificó cinco días después de la segunda inyección.

Tinción: Toluidina-bórax. Inclusión: Epón.

Cuando observamos las preparaciones de este animal que hemos cortado a una micra y teñido con toluidina-bórax, vemos que , al igual que el animal ACol-204, al que hicimos igual tratamiento, lo más característico de su papila es la desaparición de los botones gustativos del epitelio (Figs. 5.5-34 a 38). El epitelio tiene una serie de capas basales de células alargadas perpendiculares a la superficie, una capa de transición de células redondas y una serie de capas de células separadas y paralelas a la superficie, igual que los animales normales (Figs. 5.5-35 y 36). Con las técnicas histoquímicas, utilizadas en el otro animal, no apreciaríamos otra cosa, pero en los cortes de Epón hemos podido apreciar los siguientes cambios adicionales: 1) En primer lugar, el epitelio no está siempre tan bien ordenado sino que muchas veces aparece desorganizado, principalmente por la aparición de células perpendiculares en las capas de las células paralelas (Fig. 5.5-38). Estas células se presentan aisladas o agrupadas formando una empalizada y pegadas siempre al surco; son células del tipo de las intermedias pero no forman ningún tipo de estructura. También hay escasas células claras y oscuras, sueltas por el epitelio y muchas veces tocando la superficie del surco. Células aisladas del tipo de las intermedias o de las perpendiculares, aparecer muchas veces en la parte basal del epitelio pero sin decidirse a formar ningún tipo de estructura. 2) Se puede localizar algún botón que no corresponde al patrón normal debido, en la mayoría de los casos, a que no tienen cáp

sula (Fig. 5.5-35). Hemos localizado 7 botones sin cápsula formados por unas 6 ó 7 células intermedias que están en contacto con el poro basal y el conjuntivo. Hay luego 4 ó 5 botones más pequeños y mal delimitados formados por dos células claras, cuatro intermedias y dos oscuras (a veces, todas las células del botón están agrupadas o contraídas en el centro del botón dejando un anillo vacío alrededor). Solo en un corte hemos visto un botón con forma normal y poro de desembocadura al surco; la mitad de este botón está ocupada por el citoplasma de una célula clara que llega al poro apical y el resto, por 4 ó 5 células intermedias agrupadas en la base del botón, que penetran en el poro basal. Localizamos también algún resto de botón dispuesto perpendicularmente a la superficie. En resumen, podemos considerar a este animal desprovisto de botones, ya que de las pocas formaciones que describimos, ninguna es típica. El sistema de inervación es igual que el de un animal adulto normal: hay fibras gruesas en la base de los surcos, que luego ascienden por el eje de la papila (Fig. 5.5-37).

Animal: ACol-239. Sexo: Hembra. Tamaño: 200 gr.

Experimento: Dos inyecciones de colchicina en la papila, con intervalo de cinco días cada una. Se sacrificó cinco días después de la segunda inyección.

Tinción: Toluidina-bórax. Inclusión: Epón.

La colchicina ha tenido un gran efecto sobre este ani

mal, ya que observando las preparaciones que hemos hecho de su papila circunvalada, no hemos encontrado ningún botón en 177 cortes seriados (Figs. 5.5-39 y 40). El epitelio aparece formado por sus capas de células típicas con algunas interrupciones: a) células claras sueltas o en grupos de 3 ó 4 que aparecen pegadas a la superficie libre del surco, b) tres formaciones sin cápsula, constituídas por un grupo de 5 ó 6 células intermedias que pueden representar restos de botones y c) grupos de 4 ó 5 células oscuras que recuerdan los primitivos botones indiferenciados de los animales de primera semana de vida postnatal (Figs. 5.5-41 y 42).

La inervación resultó, sin embargo, completamente normal.

La observación, con microscopía electrónica, del epitelio gustativo, no permitió observar tampoco diferencias celulares equivalentes a las células de los botones. Todas las células fueron del tipo epitelial común y presentaron características normales. Con el objeto de dilucidar el posible efecto de la colchicina sobre las fibras nerviosas del plexo papilar, hemos analizado las fibras preterminales intraepiteliales y subepiteliales. En ambos casos, los componentes nerviosos presentaron características normales. La Fig. 5.5-43 muestra fibras preterminales intraepiteliales rodeadas por mesoaxones de tipo Schwann, en todo similares a los que presentan las células oscuras de los botones normales.

Animal: ACol-210. Sexo: Hembra. Tamaño: 200 gr.

Experimento: Dos inyecciones de colchicina en la papila, con intervalo de cinco días cada una. Se sacrificó cinco días después de la segunda inyección.

Tinción: ATPasa y AChE.

-AChE: La reacción para esta técnica ha resultado mínima. Solo hay un pequeño número de fibras débilmente teñidas alrededor del surco y en el eje de la papila, aunque unas pocas suben hasta el epitelio de la superficie. También entran en el epitelio de las paredes del surco (Figs. 5.5-44 a 46). Aunque con esta técnica resulta difícil localizar los botones, se puede ver que han disminuído en número. Se ven algunos con poro de desembocadura al surco, pero en la mayoría de las preparaciones no hay botones organizados, sino células del tipo de las epiteliales pero más grandes y muy claras, delimitadas de azul claro por la toluidina (Fig. 5.5-47). Igual que en otras ocasiones, hay haces más gruesos de fibras que van hacia el ganglio y neuronas dispersas por toda la zona (Figs. 5.5-44 y 45).

-ATPasa: Las preparaciones que observamos con esta técnica histoquímica nos muestran dos cosas: una gran disminución del número de botones y un aumento de la reacción y número de fibras en toda la zona de la papila (Fig. 5.5-48). Hemos observado, en un total de 16 cortes seriados, 11 botones normales de forma, positividad a la reacción y número de células. Aparte de ellos, vemos que hay unos

14 de igual forma pero de reacción muy débil, las células están muy claras, apenas teñidas (Fig. 5.5-49). También hay otros botones distintos de forma a los normales, son muy estrechos y largos, con forma de triángulo cuya base mira al conjuntivo y su vértice al surco. Sus células son mucho más claras, tienen reacción menor, son mayores en tamaño y menores en número. Los recuentos efectuados en 44 botones revelaron una media de 9 células para cada uno de estos botones triangulares. Por último, observamos también en el epitelio, unos 20 grupos de células ATPasa positivas, semejantes a las que forman los botones, pegadas unas a otras y orientadas paralelamente a la superficie del epitelio. Solo en dos ocasiones se han podido observar series de células ATPasa positivas sin formar ningún tipo de estructura ni agruparse.

Las fibras nerviosas, en cambio, tienen una reacción completamente normal o quizá algo mayor (Fig. 5.5-50). Hay una gran cantidad de fibras en el eje de la papila, alrededor de los surcos, y en la zona del ganglio. El ganglio es de tamaño normal, formado por neuronas claras y células de Schwann intensamente teñidas. Hay, incluso, mayor número de fibras que lo normal y, en algunos casos, están desordenadas sin seguir las líneas de los surcos.

Animal: ACol-238. Sexo: Hembra. Tamaño: 200 gr.

Experimento: Dos inyecciones de colchicina en la papila, con intervalo de cinco días cada una.

Se ha sacrificado cinco días después de la

Tinción: ATPasa y AChE.

-ATPasa: En este animal, que no recibió la segunda inyección en la forma correcta, la reacción de ATPasa ha resultado positiva y observamos que en el epitelio hay mu-chos botones normales. Sin embargo, aparecen botones en la superficie libre de la papila, cosa que nunca habíamos observado en animales normales para una técnica histoquímica (Fig. 5.5-55); en total, hay 8 botones situados en la superficie de la papila. También en la superficie de la papila y en algún surco, aparecen una serie de forma-ciones ATPasa positivas constituídas por 6 ó 7 células iguales a las que forman los botones, pero no están agrupadas en forma de botón sino que se disponen en forma concéntrica. Estas formaciones pueden ser restos de botones en degeneración. En total, hemos contado 220 botones ATPasa positivos en 16 cortes seriados de la papila y 10 restos de botones. La inervación es normal, hay una serie de fibras positivas alrededor de los surcos y en el eje de la papila, y fibras más numerosas perpendiculares a la papila que se conectan con el ganglio (Fig. 5.5-56). El ganglio aparece muy grande, de forma arriñonada y constituido por 6 ó 7 neuronas muy gruesas y claras. También encontramos neuronas dispersas en el eje de la papila (Figs. 5.5-57 y 58).

-AChE: La reacción para AChE fue más débil que lo que es normal. Existen fibras alrededor de los surcos y en el eje de la papila, pero todas ellas muy finas, poco numerosas y débilmente teñidas; algunas de ellas penetran

también en los botones y en el epitelio intercorpuscular (Fig. 5.5-59). Los botones son absolutamente normales. Lo que nos llama la atención es la gran cantidad de neuronas, mucho más intensamente teñidas que las fibras, que aparecen en la región del ganglio y ascienden luego por el eje papilar para llegar hasta el epitelio de la superficie libre de la papila. En toda la zona hay células cebadas (Figs. 5.5-60 y 61).

En resumen: a) se observó una desaparición de los botones en tres animales. Uno de éstos fue examinado con métodos histoquímicos, observándose una disminución de la reacción para AChE en las fibras nerviosas, un aumento de la misma en las neuronas del ganglio papilar y una reacción de ATPasa intensa, en los sitios normalmente positivos. b) en dos animales se observó una disminución sustancial en el número de botones. Uno de ellos fue observado con métodos histoquímicos, detectándose una disminución de la reacción de AChE y el sistema de inervación, y una intensa reacción positiva de las ATPasas en los sitios correspondientes. c) un animal presentó numerosos botones normales, botones en degeneración y botones en posiciones atípicas. La reacción de AChE en el sistema de inervación fue débil, pero las neuronas del ganglio papilar fueron intensamente teñidas.

D) Animal matado a los quince días:

Animal: ACol-250. Sexo: Hembra. Tamaño: 250 gr.

Experimento: Dos inyecciones de colchicina en la papila, con intervalo de cinco días cada una. Se sacrificó quince días después de la segunda inyección.

Tinción: Toluidina-bórax. Inclusión: Epón.

En este animal que hemos sacrificado con un intervalo de tiempo muy superior al que veníamos realizando, observamos que todo el sistema ha vuelto a la normalidad. Hay un gran número de botones en el epitelio, con poros al surco y completamente maduros (Fig. 5.5-62). Tienen un gran número de células sin signos de degeneración o desorganización y predominan las células de tipo oscuro, como en un animal adulto normal (Fig. 5.5-63). En cuanto al sistema de inervación, observamos fibras gruesas subiendo por el eje de la papila y otras que rodean a los surcos por la parte basal y confluyen en la región del ganglio.

5º) Doble inyección intrapapilar de colchicina y doble inyección intraperitoneal:

Animal: ACol-205. Sexo: Macho. Tamaño: 300 gr.

Experimento: Se le han hecho 4 inyecciones de colchicina alternadas: dos intraperitoneales y dos en la papila, con intervalos de dos días cada una. Se ha sacrificado dos días después de la segunda inyección.

Tinción: AChE y ATPasa.

-AChE: Con este nuevo experimento, observamos una pa

pila normal de forma y tamaño, pero grandes cambios en cuanto a sus reacciones histoquímicas. La reacción de AChE es tan débil y escasa que puede considerarse nula: solo una o dos fibras muy delgadas y pálidas alrededor de uno de los surcos y que no penetran en el epitelio, ni en la región del ganglio ni en la base de la papila. Los botones han desaparecido por completo (Figs. 5.5-64 y 65).

-ATPasa: Esta técnica nos confirma la total ausencia de botones en el epitelio de la papila de este animal. En un seriado de 11 cortes, solo en un corte hemos advertido, en el epitelio del surco, la presencia de unas cuantas células desorganizadas con una reacción ATPasa positiva débil. Esto puede corresponder a un resto de botón.

El ganglio, en cambio, aparece muy prominente, sus neuronas y células de Schwann se tiñeron irregularmente. También hay muchas fibras positivas alrededor de los surcos y en el eje de la papila, acompañadas de células de Schwann intensamente teñidas y de neuronas aisladas por toda la zona (Figs. 5.5-66 y 67).

En resumen, este animal presentó pérdida total de botones, reacción de AChE negativa y reacción de ATPasa positiva en el sistema de inervación y muy prominente a nivel del ganglio.

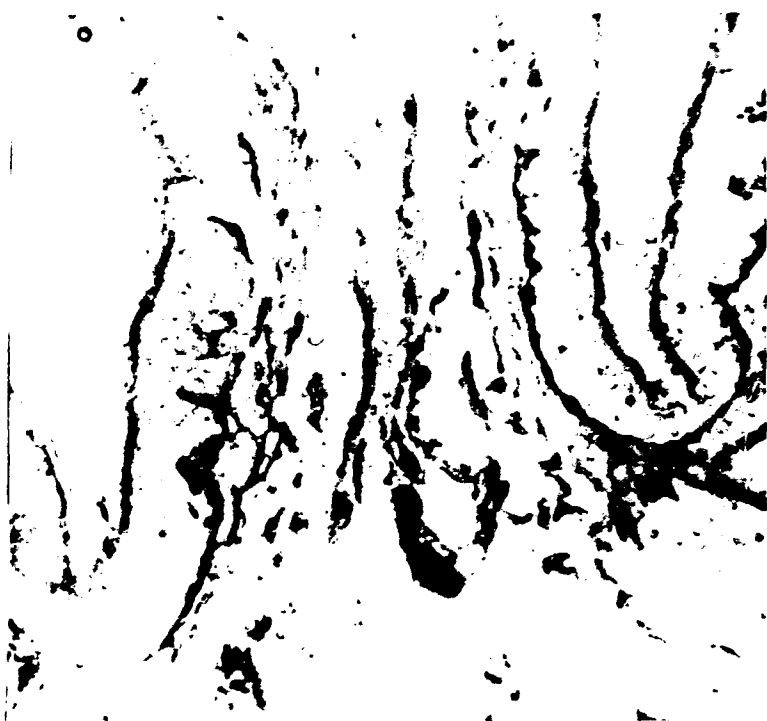


Fig. 5.5-1.- Corte transversal de la papila circunvalada del animal ACol-80, 6 días después de la inyección de colchicina. La reacción ha disminuído considerablemente con respecto a los animales controles. Tinción: AChE-azul de toluidina. 150x.



Fig. 5.5-2.- Detalle del ganglio del mismo animal, mostrando, en cambio, que la reacción AChE positiva, es mayor a este nivel. 600x.

Fig. 5.5-3.- Otro aspecto de la papila, 6 días después de la inyección de colchicina (animal ACol-80). Tinción: AChE-azul de toluidina. La reacción es muy escasa y limitada al tercio inferior de la papila. 100x.



Fig. 5.5-4.- Animal ACol-56. Tinción: AChE-azul de toluidina. 11 días después de haber inyectado colchicina, la reacción es completamente normal en extensión e intensidad. 200x.



Fig. 5.5-5.- Animal ACol-56, mostrando reacción AChE positiva disminuída en el plexo papilar pero aumentada en la región del ganglio. 100x.



Fig. 5.5-6.- Detalle de la figura anterior mostrando el aumento de la reacción en las neuronas ganglionares. 600x.



Fig. 5.5-7.- Aspecto de la papila circunvalada de un animal sacrificado 12 días después de la inyección de colchicina (ACol-42). Tinción: ATPasa. La reacción ha resultado normal o incluso más intensa que en los animales controles. Flechas: botones gustativos. 200x.



Fig. 5.5-9.- Corte frontal de la papila del animal ACol-42 (12 días después de la inyección de colchicina). Tinción: AChE-azul de toluidina. La reacción positiva ha quedado limitada al tercio basal de la papila. B: botones gustativos. 200x.

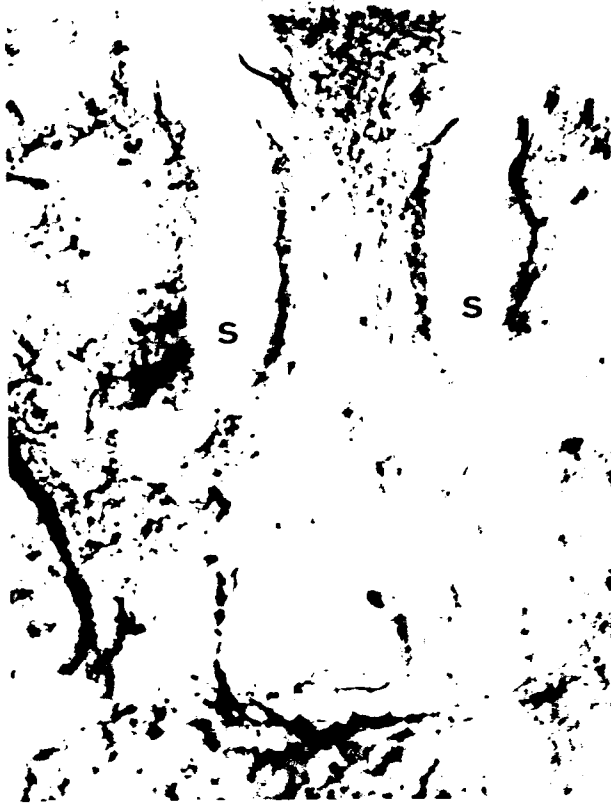


Fig. 5.5-10.- Animal inyectado con colchicina en la parte anterior del surco (ACol-87). Tinción: ATPasa. La reacción ha resultado negativa en las fibras y botones. S: surcos papilares. 100x.



Fig. 5.5-11.- El mismo animal, teñido con la técnica de AChE-azul de toluidina, muestra que esta reacción si es positiva para las fibras del plexo, aunque limitada al tercio basal de la papila. Flechas: botones gustativos. 100x.



Fig. 5.5-12.- Animal ACol-87. Tinción: AChE-azul de toluidina. La reacción es más intensa en las neuronas de la parte basal de la papila (N). 200x.



Fig. 5.5-13.- Animal ACol-87. Tinción: AChE-azul de toluidina. La reacción es también mayor en las fibras que van hacia la región del ganglio (flecha). 200x.

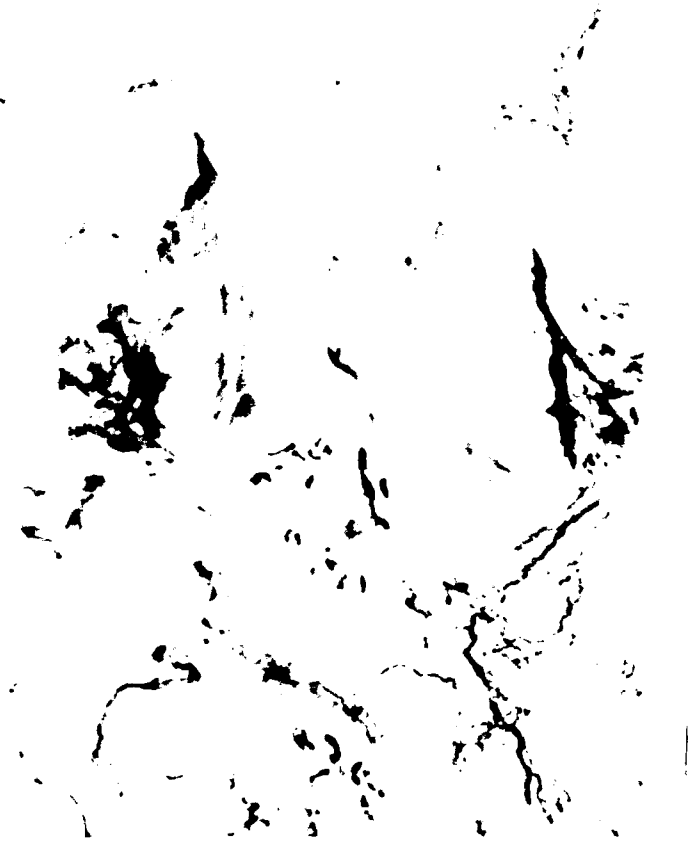


Fig. 5.5-14.- Papila central de un animal, a los 12 días de la inyección subpapilar de colchicina (ACol-81). Tinción: AChE-azul de toluidina. La reacción solo muestra escasas fibras AChE positivas en la parte basal de la papila. 100x.

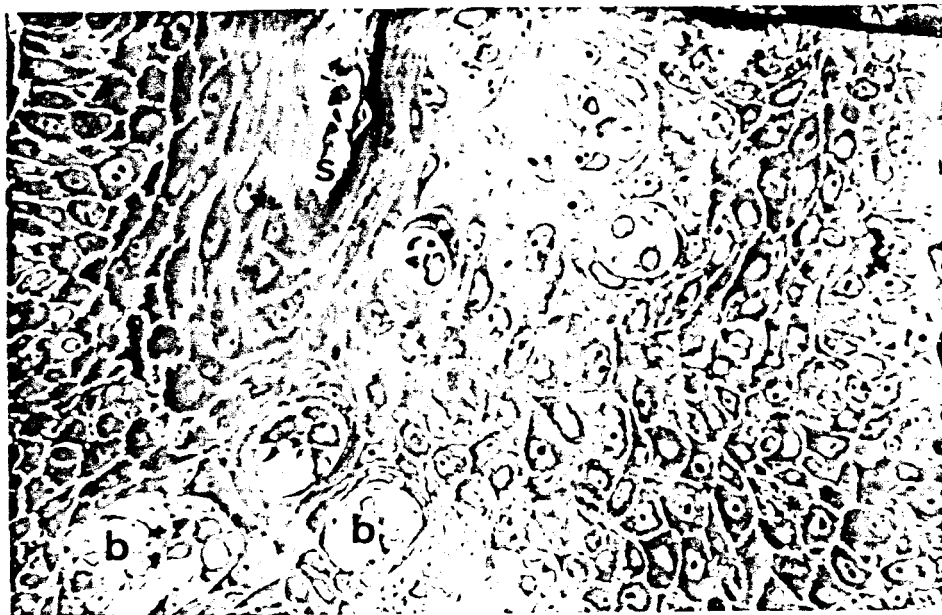


Fig. 5.5-15.- Epitelio gustativo de un animal sacrificado dos días después de la doble inyección de colchicina (ACol-215). Inclusión: Epón. Tinción: toluidina-bórax. S: surco. B: botones gustativos con mayor número de células claras que los animales controles. 500x.



Fig. 5.5-16.- Otro aspecto del epitelio gustativo del mismo animal. El número de botones ha disminuído notablemente con respecto a los animales controles. C: conectivo. E: epitelio. 500x.

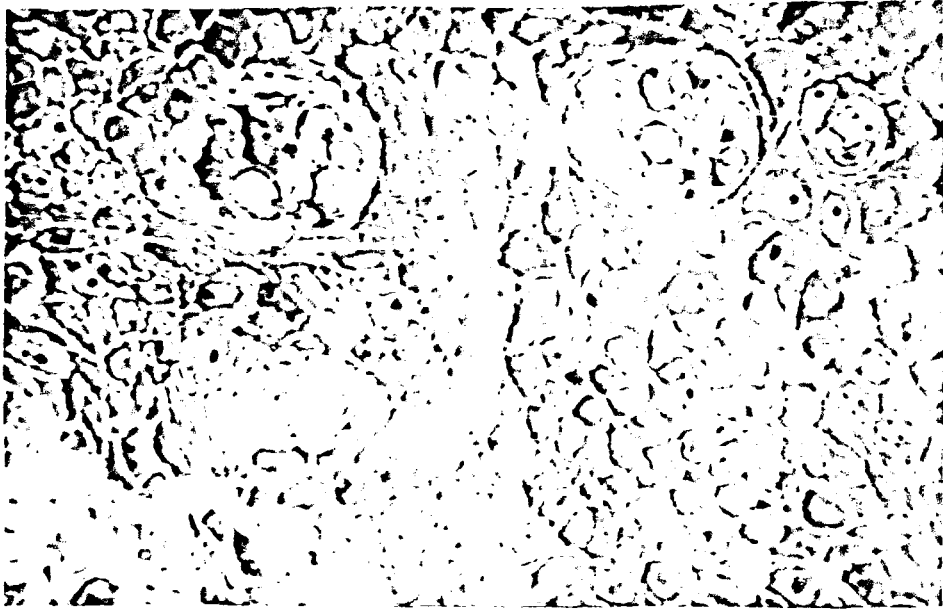


Fig. 5.5-17.- Botones cortados transversalmente, de la pila central del animal ACol-215. Nótese la disminución general del tamaño de los botones y el aumento de células claras. Inclusión: Epón. Coloración: toluidina-bórax. 600x.



Fig. 5.5-18.- Detalle de botones del animal anterior, mostrando pérdida de la cápsula y disminución general del tamaño de las células. Flechas: botones formados casi exclusivamente por células claras. D: botón en degeneración. 700x.



Fig. 5.5-19.- Papila, en corte transversal, del animal ACol-221, sacrificado dos días después de la doble inyección de colchicina. Inclusión: Epón. Coloración: toluidina-bórax. El número de botones ha disminuído drásticamente. B: botones gustativos. G: conducto glandular. 100x



Fig. 5.5-20.- Surco circunvarar del mismo animal que la figura anterior (ACol-221), mostrando ausencia de botones en este sector del epitelio gustativo. 300x.



Fig. 5.5-21.- Botón remanente en el epitelio del surco pa
pilar del animal ACol-221, formado casi exclusivamente por
células claras e intermedias. 250x.



Fig. 5.5-22.- Aspecto de botones resistentes al tratamien
to con colchicina. Animal ACol-221. Sin embargo, el núme-
ro de células claras ha aumentado. 250x.



Fig. 5.5-23.- Botones en degeneración, formados por una mayoría de células claras. Animal ACol-221. 250x.



Fig. 5.5-24.- Surco circunvalar en corte frontal. Animal ACol-214, sacrificado cuatro días después de la doble inyección de colchicina. Inclusión: Epón. Coloración: toluicina-bórax. Hay gran cantidad de botones en el epitelio, pero presentan más células claras que los correspondientes animales controles.. 200x.



Fig. 5.5-25.- Un botón del mismo animal, mostrando el gran aumento de células claras intracorporculares. S: surco. C: conectivo. 300x.

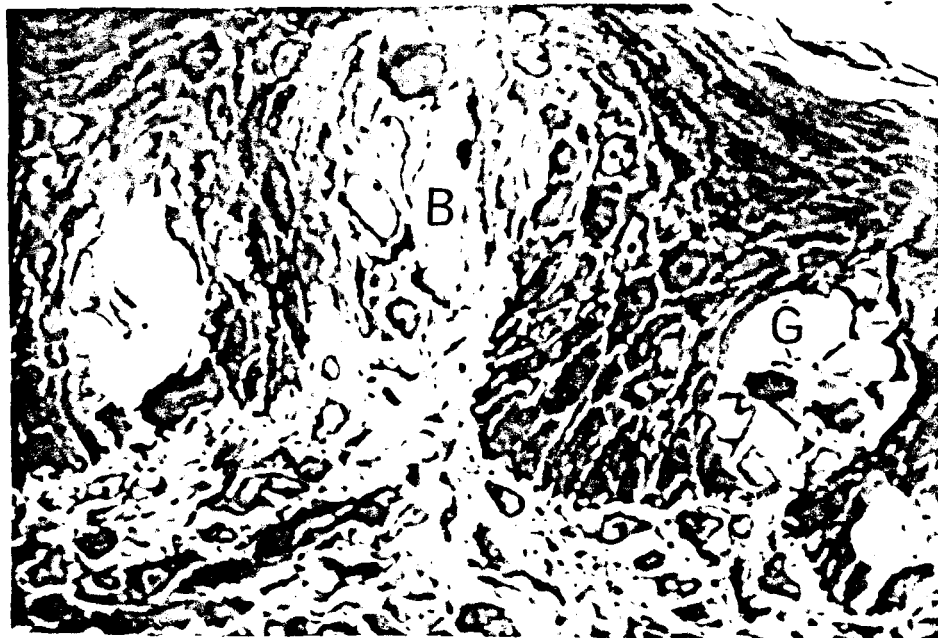


Fig. 5.5-26.- Botones anómalos del epitelio gustativo del animal ACol-214. B: botón sin cápsula. C: botón en degeneración con un gran espacio claro. G: botón con células de sorganizadas. 400x.



Fig. 5.5-27.- Otro aspecto de los botones del mismo animal (ACol-214), mostrando el aumen to de las células claras. 400x.



Fig. 5.5-28.- Detalle de una célula clara aislada, en el epite-lio gustativo del ani-mal ACol-214. 650x.



Fig. 5.5-29.- Corte transversal de la papila de un animal sacrificado 5 días después de la doble inyección de colchicina (ACol-204). Tinción: ATPasa. La reacción es normal para las fibras del eje y base de la papila, pero los botones han desaparecido del epitelio. S: surcos. E: epitelio. 100x.

Fig. 5.5-30.- El mismo animal. con la misma técnica, mostrando las fibras del plexo intensamente teñidas. S: surcos. G: ganglio. 100x.





Fig. 5.5-31.- Papila del animal ACol-204. Tinción: AChE-azul de toluidina. La reacción es mínima en las fibras del eje papilar, pero ha aumentado en la base y región del ganglio (flecha). No hay botones en el epitelio. 100x.



Fig. 5.5-32.- El mismo animal, con la misma técnica, nos muestra idénticas características. S: surco. G: conducto glandular. 150x.



Fig. 5.5-33.- Detalle de las fibras AChE positivas que entran al epitelio a pesar de la falta de botones. Animal ACol-204. 300x.



Fig. 5.5-34.- Corte transversal de una papila central, de cuyo epitelio han desaparecido los botones gustativos. Animal ACol-213 (a los 5 días de la doble inyección de colchicina). Inclusión: Epón. Coloración: toluidina-bórax. 150x.

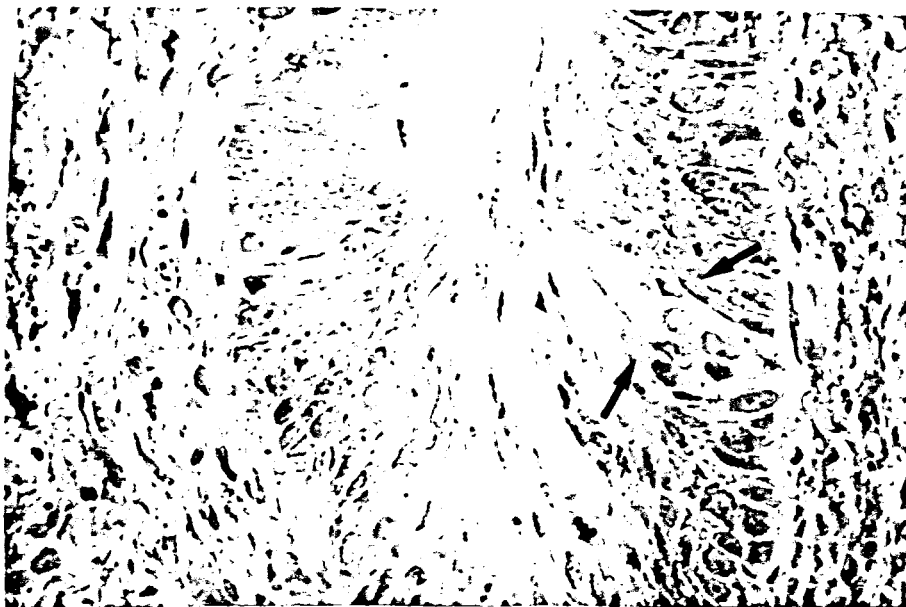


Fig. 5.5-35.- Detalle del surco papilar del animal anterior mostrando un botón remanente que ha perdido la cápsula (flechas). Inclusión: Epón. Coloración: toluidina-bórax. C: conectivo. 350x

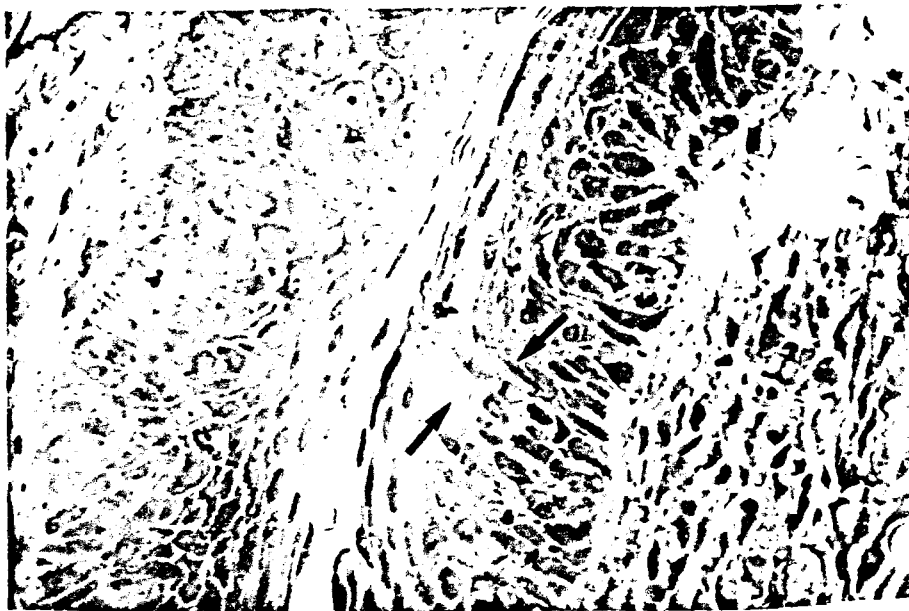


Fig. 5.5-36.- Otro aspecto del surco circunvalar del animal ACol-213, con un botón sin cápsula que está perdiendo sus células hacia el exterior (flechas). 350x.



Fig. 5.5-37.- Animal ACol-213. Inclusión: Epón Coloración: toluidina-bórax. En el epitelio no hay botones, pero en el conectivo, el plexo nervioso no presenta degeneración. 100x.

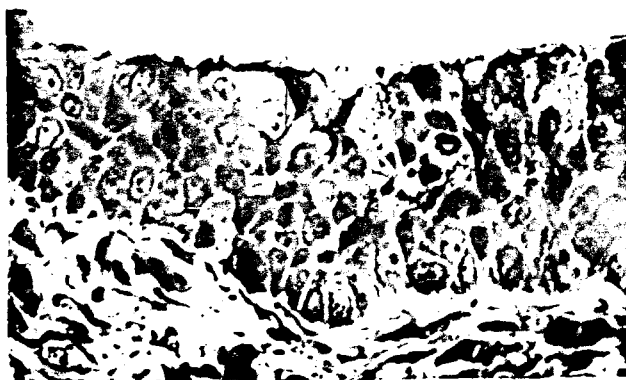


Fig 5.5-38.- Aspecto del epitelio gustativo del animal anterior, mostrando remanentes de botones gustativos. 600x.



Fig. 5.5-39.- Otro animal sacrificado 5 días después de la segunda inyección de colchicina (ACol-239). Inclusión: Epón. Coloración: toluidina-bórax. También han desaparecido los botones después del tratamiento. 100x.



Fig. 5.5-40.- A mayor aumento, se ve claramente la ausencia de botones en el epitelio gustativo (Animal ACol-239). C: conectivo. 200x.



Fig. 5.5-41.- Epitelio gustativo con restos de botones, como resultado del tratamiento con colchicina. Estos botones son similares a los del animal normal de la primera semana postnatal. Animal ACol-239. 300x.



Fig. 5.5-42.- Detalle de la figura anterior. 350x.



Fig. 5.5-43.- Fibras nerviosas intraepiteliales en un animal cuyos botones gustativos han desaparecido después de una doble inyección de colchicina. Animal ACol-239. Estas fibras (FN) están rodeadas por laminillas citoplasmáticas (L) similares a las que presentan las células de Schwann. 30.000x.



Figs. 5.5-44 a 46.- Tres aspectos de la papila circunvalada del animal ACol-210, sacrificado 5 días después de la segunda inyección de colchicina. Tinción: AChE-azul de toluidina. La reacción ha resultado muy disminuída a nivel del plexo papilar. 100x



Fig. 5.5-47.- El surco de la papila anterior, mostrando la entrada de fibras intactas en el epitelio. Se puede distinguir un botón remanente (flechas). 250x.



Fig. 5.5-48.- Corte transversal de la papila central. Animal ACol-210. Tinción: ATPasa. Se muestra una reacción normal para las fibras papilares, pero los botones son escasos (flechas). 100x.

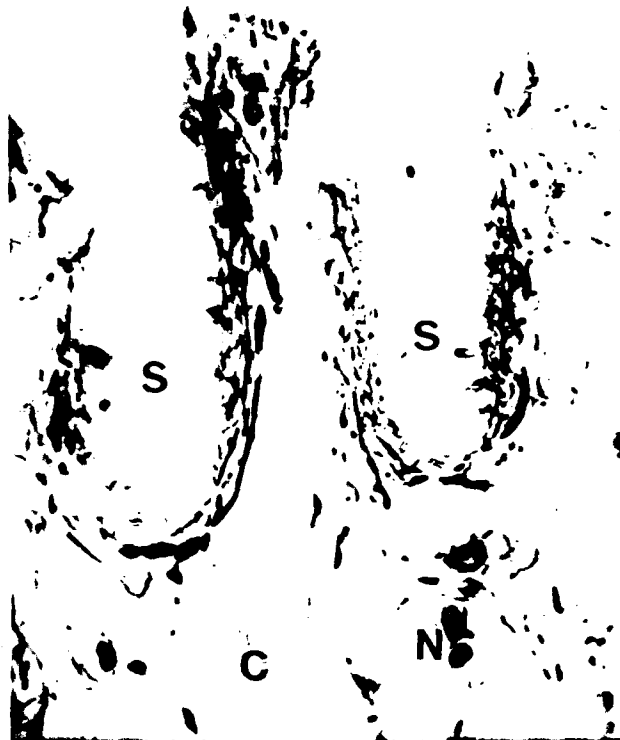


Fig. 5.5-49.- Otro aspecto de la papila mostrando las mismas características. S: surcos. C: conectivo. Flechas: botones gustativos. N: neuronas. 100x.



Fig. 5.5-50.- Detalle de los botones (flechas) débilmente teñidos por la ATPasa. Animal ACol-210. F: fibras nerviosas subcutáneas normales. 400x.

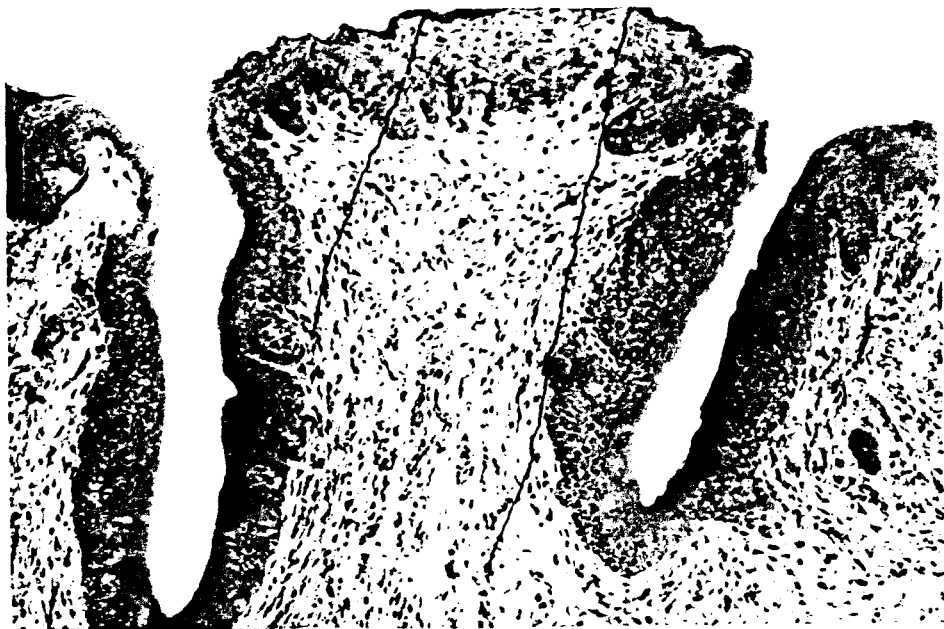


Fig. 5.5-51.- Animal ACol-238, sacrificado 5 días después de la doble inyección de colchicina. Corte transversal de la papila. Se observa algún botón en el epitelio, pero su número ha disminuído de manera notable. Inclusión: Epón. Coloración: toluidina-bórax. 100x.



Fig. 5.5-52.- Detalle del surco circunvalar del animal anterior, mostrando la disminución del número de botones, así como de su tamaño y células constitutivas (flechas). 250x.

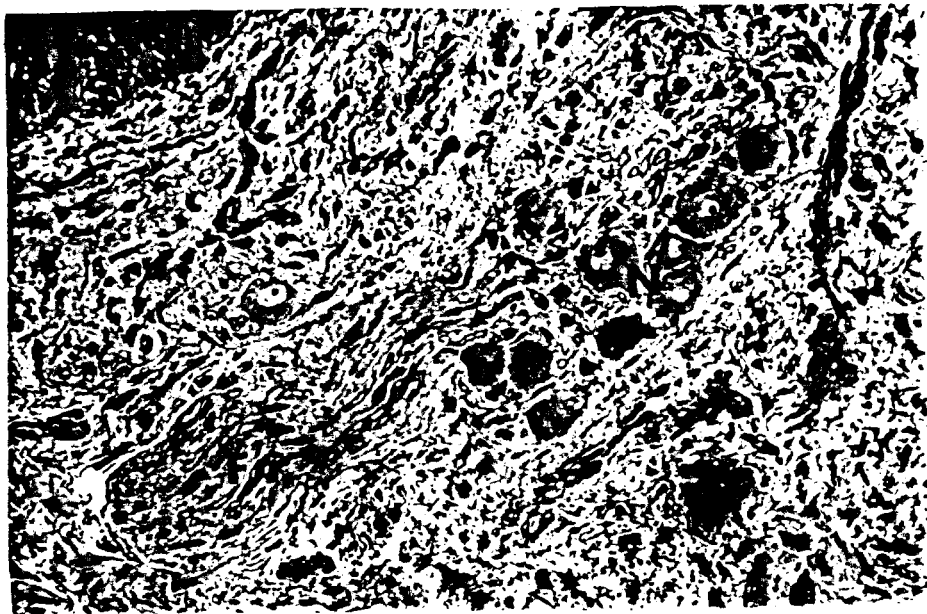


Fig. 5.5-53.- Fibra nerviosa (F) y neuronas (N) intactas a pesar del tratamiento con colchicina. Animal ACol.238. In-clusión: Epón. Coloración: toluidina-bórax. S: fondo del surco circunvalar. 400x.

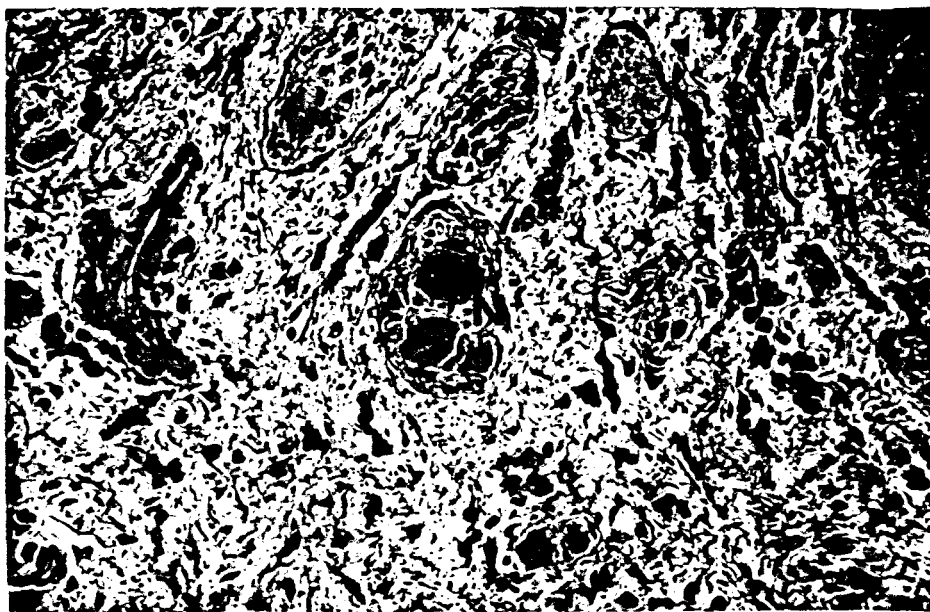


Fig. 5.5-54.- Otro aspecto del conectivo subpapilar del animal anterior mostrando que el componente nervioso es normal. N: neuronas. S: fondo del surco papilar. 400x.

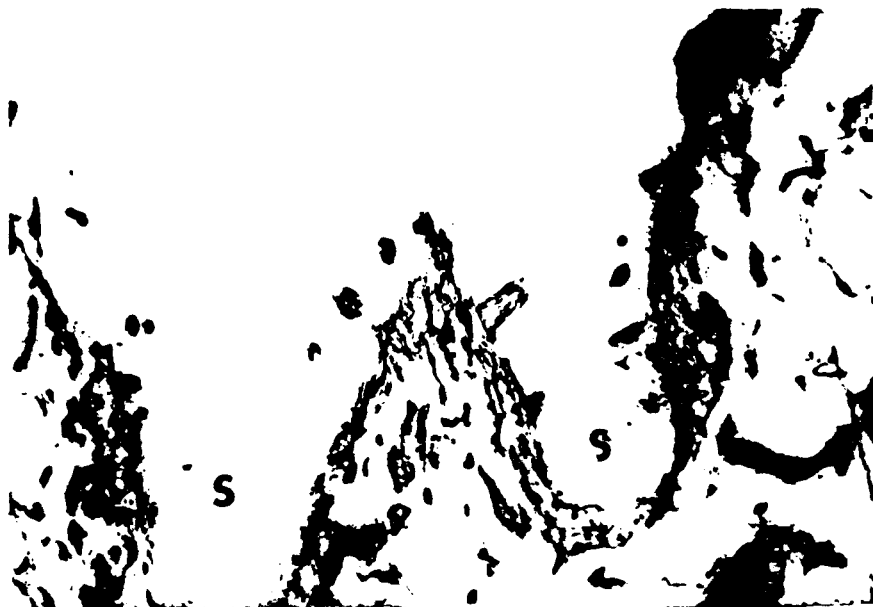


Fig. 5.5-55.- Animal ACol-228, sacrificado 5 días después de la doble inyección de colchicina. Tinción: ATPasa. La papila, en corte oblicuo, muestra botones ATPasa positivos. S: surcos. 100x.



Fig. 5.5-56.- La misma papila del animal anterior, que es normal en cuanto a las fibras que la inervan y a los botones. Tinción: ATPasa. 150x.



Fig. 5.5-57.- Tercio basal de la papila circunvalada del animal ACol-228. Tinción: ATPasa. R: ramas nerviosas aferentes. G: ganglio. E: epitelio. S: surcos. 200x.



Fig. 5.5-58.- Ganglio papilar del mismo animal, teñido con la técnica de ATPasa. La reacción es más intensa en las células satélites que las neuronas. 1.000x.



Fig. 5.5-59.- Animal ACol-228. Tinción: AChE-azul de toluidina. La reacción en el plexo es ligeramente inferior a lo normal. 100x.



Fig. 5.5-60.- El ganglio papilar, teñido con la técnica de AChE-azul de toluidina, muestra un aumento de la reacción. Animal ACol-228. G: ganglio. N: rama nerviosa. C: células cebadas. 400x.

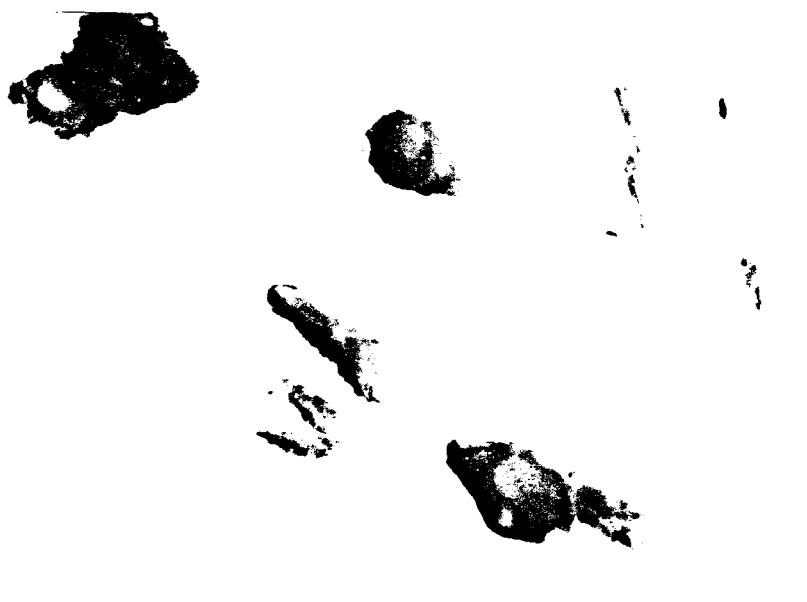


Fig. 5.5-61.- Neuronas intensamente teñidas por la reacción de AChE. Animal ACol-228. 400x.

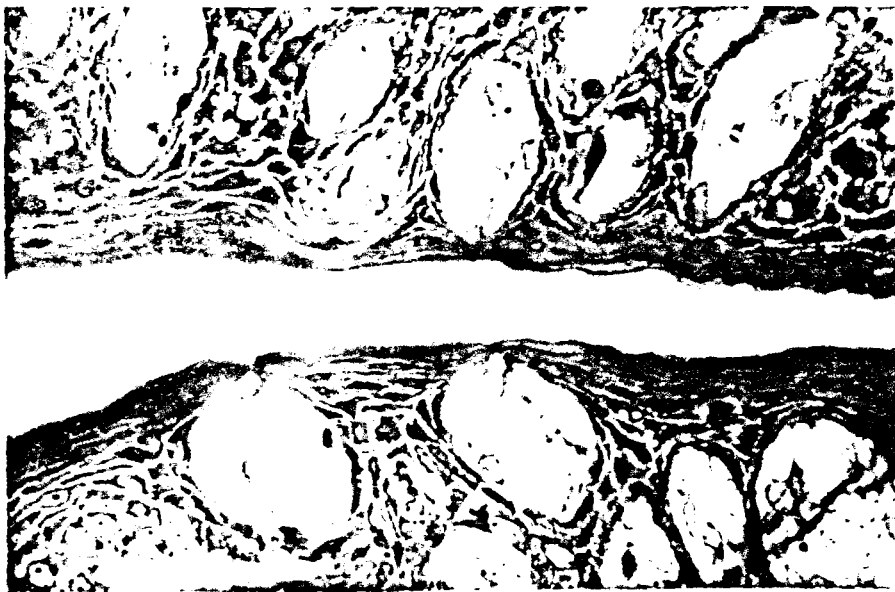


Fig. 5.5-62.- Epitelio gustativo a los 15 días de la doble inyección de colchicina. Animal ACol-250. Inclusión: Epón. Coloración: toluidina-bórax. 300x.



Fig. 5.5-63.- Animal ACol-250. Botones gustativos de idéntico aspecto que los de los animales controles. Compárense con los de los animales anteriores. 500x.



Fig. 5.5-64.- Papila central desprovista de botones, de un animal inyectado con colchicina local e intraperitonealmente (ACol-205). Tinción: AChE-azul de toluidina. 100x.

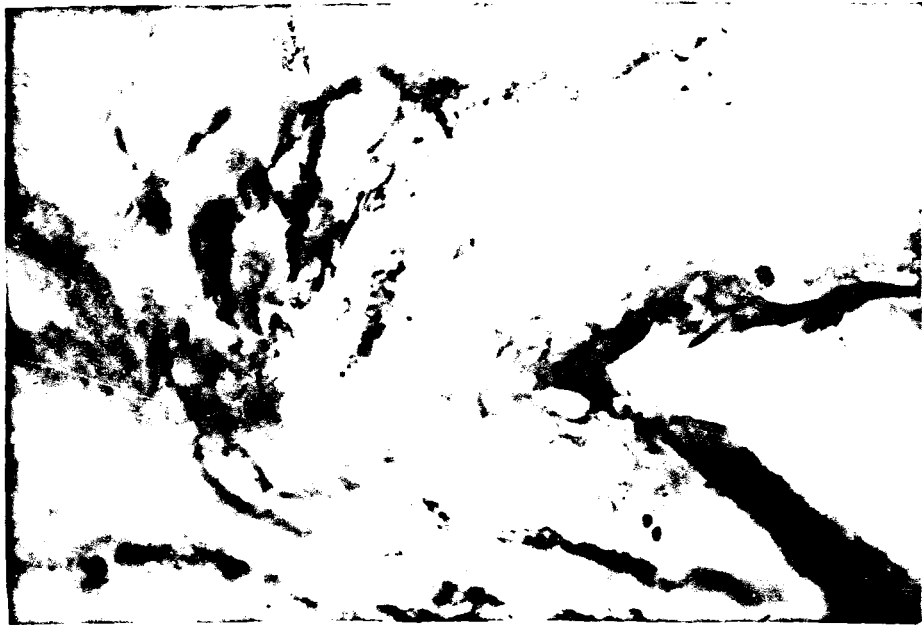


Fig. 5.5-65.- Surco papilar del animal anterior. La reacción es muy débil, y el epitelio está limpio de botones. Tinción: AChE-azul de toluidina. 300x.



Fig. 5.5-66.- Animal ACol-205. La reacción es fuerte en las fibras nerviosas, pero no hay botones. S: surcos. Flechas: límites del epitelio. Tinción: ATPasa. 100x.

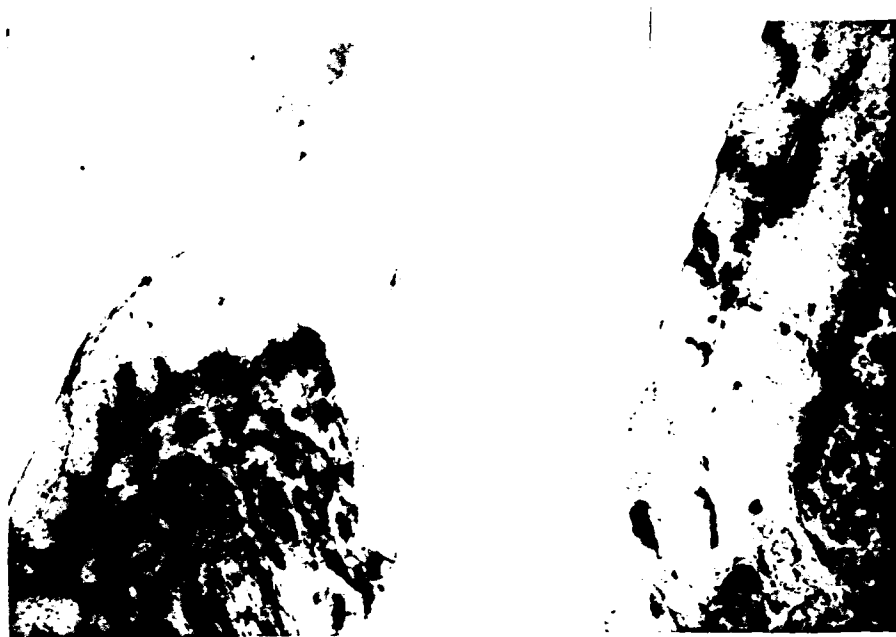


Fig. 5.5-67.- Detalle del surco de la papila del animal anterior. 150x.

Capítulo 6. DISCUSSION.

6.1.- CARACTERISTICAS FUNDAMENTALES DEL PROCESO DE DIFERENCIACION DE LAS CELULAS GUSTATIVAS.

En el presente trabajo se han estudiado las características estructurales del proceso de diferenciación de la papila circunvalada central de la rata y de los botones gustativos en particular, observándose que existe un paralelismo entre el desarrollo del epitelio lateral de la papila y de las paredes del surco (epitelio gustativo) y la diferenciación de los botones gustativos. El epitelio gustativo aparece profusamente innervado por fibras AChE positivas, mucho tiempo antes de que comience el proceso morfológico de diferenciación de los botones.

El animal recién nacido presentó un plexo nervioso papilar bien desarrollado aunque todavía no completamente sistematizado en su distribución. De todas formas, este plexo apareció circunscrito al epitelio específico donde se desarrollarán los botones gustativos. La íntima relación existente entre innervación y diferenciación del epitelio es, por tanto, evidente.

De acuerdo a numerosos trabajos que comienzan en el año 1875 (Ranvier, 1875; Olmsted, 1920; Guth, 1957; Iwamura, 1970), los botones gustativos de las papilas circunvaladas y fungiformes de la lengua, son estructuras neurodependientes, ya que desaparecen con la denervación y vuelven a diferenciarse si el epitelio es reinervado con el nervio correspondiente o bien con otros nervios portadores de componentes sensitivos. Por el contrario, la reinerva

ción de la papila con un nervio motor (hipogloso) no induce la formación de nuevos botones por lo que, en definitiva, estas estructuras son "neuro-sensitivo dependientes" (Guth, 1958). El mecanismo mediante el cual los botones gustativos se diferencian, no ha sido aún dilucidado. La diferenciación de los botones se debería a una especialización del extremo distal de las fibras nerviosas mismas, tal como postulara Tuckerman en 1889, o bien, de acuerdo a la mayoría de los trabajos posteriores, a una especialización circunscrita de las células epiteliales de la superficie dorsal de la lengua.

De acuerdo a Gräberg, 1898; Marchand, 1902; Hellman, 1922; de Lorenzo, 1958, las fibras nerviosas inducirían procesos mitóticos en las células basales del epitelio gustativo y de estas divisiones celulares surgirían luego las células fusiformes del interior de los botones.

La renovación de las células de los botones gustativos, fue estudiada por Beidler y Smallman, 1965, mediante el bloqueo con colchicina de las divisiones mitóticas de las células epiteliales que rodean a los botones. Se realizó un análisis radioautográfico, con ayuda de timidina triada, el cual mostró que las células que rodean a los botones gustativos (células capsulares) se dividen mitóticamente y que algunas de las células hijas penetran al botón donde van siendo lentamente desplazadas hacia la región central. De acuerdo a estos autores, la vida media de las células gustativas es de alrededor de 10 días. Estos trabajos, realizados en papilas de tipo fungiforme, sugieren

que las células pericorpusculares, que nosotros denominamos capsulares, incorporan la timidina en el momento de la duplicación de su ADN. Después de la división, las células hijas penetran de alguna forma al interior del botón donde serían posteriormente inervadas por una de las terminaciones intraepiteliales. Estas células se diferenciarían entonces como células gustativas para degenerar finalmente al cabo de unos 10 días. Mientras tanto, continuaría existiendo una actividad mitótica a nivel de las células capsulares, a una velocidad de alrededor de una célula cada hora, pero solamente una de cada dos células hijas penetraría en el botón cada 10 horas. Cuando una nueva célula penetra en el botón gustativo, alguna fibra nerviosa fina enviaría una expansión terminal que haría contacto con la célula en la región basal del botón. De acuerdo a Beidler y Smallman, el envejecimiento celular se acompaña de un desplazamiento de las células en dirección al polo apical por donde serían finalmente eliminadas. Durante este desplazamiento, las células gustativas harían contacto con nuevas fibras nerviosas localizadas en regiones cada vez más superficiales. Si tal fuera el caso, una fibra nerviosa que ocupara una posición basal, haría contacto siempre con células jóvenes, mientras que otras, las más apicales, contactarían solamente con células envejecidas. De acuerdo a esta interpretación de Beidler y Smallman (1965), existiría un flujo continuo de células desde la base del botón hacia el poro apical, pero las fibras nerviosas mantenerían una posición estable. Los mismos autores consignan,

sin embargo, la posibilidad de que ambos componentes, células gustativas y fibras nerviosas, se desplacen en conjunto.

Es probable que un efecto tóxico de la colchicina ha ya alterado, en estos experimentos, la diferenciación de los botones, ya que Beidler y Smallman observaron que la respuesta a la estimulación química de sus papilas colchicicinizadas, disminuyó en un 50%, tan solo a las tres horas de la inyección, y esta caída fue registrada eléctricamente. Esta alteración fisiológica no puede ser debida al efecto antimitótico de la droga. Se conoce que, solo en dosis tóxicas, la colchicina actúa sobre la transmisión sináptica y la conducción de los impulsos (Perisic y Cuenod, 1972).

Tanto la microscopía óptica como la microscopía electrónica, han demostrado que los botones gustativos están constituídos por dos o tres tipos celulares (de Lorenzo, 1958; Kimura, 1961; Rhodin, 1963; Tateda, 1964; Gray y Watkins, 1965; Murray y Murray, 1967; Murray y col., 1969; Paran y col., 1975). En general, el microscopio electrónico ha revelado la existencia de dos tipos celulares que han sido definidos como células gustativas y sustentaculares en el conejo (Engstrom y Rytzner, 1956; Trujillo-Cenoz, 1957; de Lorenzo, 1958; Nemetschek-Gansler y Ferner, 1964), mono (Murray y Murray, 1960) y rata (Gray y Watkins, 1965; Beidler y Smallman, 1965). De acuerdo a la mayoría de los autores, las células gustativas presentarían un aspecto oscuro, mientras que las células sustentaculares estarían constituídas por un citoplasma acuoso, vesiculado y pobre

en organoides. Sin embargo, Rhodin (1963), demostró que ambos tipos celulares presentan microvellosidades en el interior del poro gustativo apical y están igualmente inervadas, por lo que tanto las células claras como las oscuras podrían ser consideradas células receptoras. El problema no está aún aclarado.

Murray y Murray (1967), describieron tres tipos de células gustativas en la papila foliada del conejo. Las células claras y oscuras resultan, en este caso, similares a las observadas por otros autores, pero el tercer tipo de células, que fueron denominadas intermedias, comparten las características de las otras dos. Recientemente, tres tipos de células gustativas han sido también descritos en distintas especies de Peces (Farbman y Yonkers, 1971; Grover-Johnson y Farbman, 1976).

Con objeto de estudiar las interrelaciones entre los distintos tipos de células gustativas y sus asociaciones con las fibras nerviosas intracorpúsculares, Iwayama (1970), analizó los cambios en la población celular de los botones gustativos y su inervación sensorial durante la degeneración y regeneración. Este autor refiere también la existencia de tres tipos celulares en los botones gustativos de la papila del conejo y considera que las células del tipo oscuro son las células gustativas y que las claras son células de sostén. Después de la denervación de la papila, observó una desaparición gradual de los botones, la cual se completa el día 14 posterior a la operación. Determinó que las células oscuras son los primeros elementos en desapa

recer y las células claras, los últimos. Esto hizo pensar en la posibilidad de que las células oscuras o "receptoras" sean las más sensibles del sistema. Inversamente, la reinervación de los botones produjo la aparición, en primer lugar, de las células oscuras (alrededor de 40 días después de la operación), mientras que las células claras fueron visibles nueve días después. Este hecho no fue convenientemente explicado.

En resumen, los datos bibliográficos comentados apoyan las siguientes conclusiones:

1) las células de los botones son neuro-sensitivo dependientes.

2) todas las células de los botones procederían de divisiones mitóticas de las células capsulares.

3) los botones contienen células oscuras, intermedias y claras.

4) las células oscuras (y quizá también las intermedias y claras) serían las células receptoras gustativas.

Las observaciones del material destinado al estudio del desarrollo ontogenético de los botones gustativos presentadas en el presente trabajo, permiten una reevaluación del significado de los tres tipos de células corpusculares.

1º) Los botones gustativos comienzan a diferenciarse durante la primera semana de vida y en un primer momento están constituidos exclusivamente por una agrupación circunscrita de células, en su mayoría oscuras, cuyo eje mayor es perpendicular a la superficie epitelial. En el resto del epitelio las células están agrupadas en forma de eso

tratos paralelos a la superficie libre. Los botones primitivos no están delimitados todavía por una cápsula definida y las células que los constituyen solo pueden distinguirse del resto de las células epiteliales, por su orientación. Estas células son de forma alargada e irregular, pero esta característica está también presente en las células de los estratos superficiales del epitelio general. Otro detalle de interés, en los botones primitivos, es la virtual ausencia de figuras mitóticas entre sus elementos constitutivos. Las figuras mitóticas son relativamente escasas también en el resto del epitelio gustativo. El análisis de los botones de la primera semana con microscopía electrónica reveló que sus células son similares a las células epiteliales vecinas; se mantienen unidas por desmosomas y presentan abundantes tonofilamentos. En el espacio intercelular se aprecian escasas fibras nerviosas de pequeño calibre.

Las observaciones realizadas en estas papilas inmaduras de la primera semana, plantean una serie de interrogantes:

a) ¿Existe alguna relación entre la actividad mitótica del epitelio y la aparición de los botones gustativos?. Nuestras observaciones indican que la diferenciación de los botones durante la primera semana no está relacionada con mitosis de células epiteliales, ya que no fue posible apreciar esta actividad a nivel de esas estructuras.

b) ¿Existe alguna relación entre la penetración de las fibras nerviosas en el epitelio y la diferenciación de

los botones gustativos?. Trabajos preliminares realizados por otros autores parecen demostrar la realidad de este hecho (State y Bowden, 1974). Los resultados presentes indican también que las fibras AChE positivas del plexo papilar penetran al epitelio con anterioridad a la formación de los botones.

c) ¿Cual es el origen de las células oscuras que constituyen los botones inmaduros de la primera semana?. Estas células podrían representar una diferenciación de los elementos epiteliales o bien, una diferenciación de las células de Schwann que acompañan a las fibras nerviosas intraepiteliales. El conocimiento del origen de las células gustativas es fundamental para comprender el mecanismo de la neurodependencia de este sistema.

Ya hemos mencionado que la mayoría de los autores concuerda en afirmar que las células gustativas derivan de las células epiteliales comunes del dorso de la lengua. Sin embargo, nuestras observaciones sugieren lo contrario. En las preparaciones obtenidas con anterioridad a la aparición de los botones primitivos (papilas de animal recién nacido), se observaron fibras nerviosas orientadas perpendicular u oblicuamente a la base del epitelio. Estas fibras parecen penetrar al mismo, acompañadas de sus células de Schwann. El análisis de las células de Schwann reveló que tienen aspecto fusiforme y citoplasma basófilo. Estas células presentan idéntica estructura que algunas de las observadas en asociación con fibras nerviosas. Tal es el caso ilustrado por las Figs. 5.2-4a, b y c.

En las preparaciones de microscopía óptica, las presuntas células de Schwann intraepiteliales se distinguen de las demás células de este tejido, por su orientación (perpendicular a la superficie) y su intensa basofilia. Por otra parte, el análisis comparativo, con microscopía electrónica, de las células de Schwann subepiteliales e intraepiteliales, reveló que ambas poseen una estructura similar; presentan un citoplasma rico en filamentos, borde irregular y prolongaciones citoplasmáticas (mesoaxones) de volumen variable, que envuelven a las fibras nerviosas preterminales. En preparaciones de microscopía electrónica resulta difícil distinguir las células de Schwann que yacen inmediatamente por debajo del epitelio, del resto de las células epiteliales ya que ambas tienen un citoplasma denso, rico en filamentos, núcleos irregulares y prolongaciones citoplasmáticas pequeñas. Con mayor razón, resulta imposible distinguir una célula de Schwann de las células oscuras que constituyen a los botones primitivos. Ambas células, además de presentar idénticas características citoplasmáticas, emiten mesoaxones que rodean a las fibras nerviosas amielínicas.

El único elemento distintivo parece ser la reactividad de los dos tipos celulares a la reacción de ATPasa. Las células epiteliales son negativas mientras que las células de Schwann son siempre ATPasa positivas. Un hecho "aparentemente opuesto al posible origen glial de las células de los botones primitivos es que éstas se tiñen negativamente con esta técnica.

El análisis de los botones gustativos de la segunda semana aportó elementos de juicio en apoyo de un origen glial de las células gustativas.

2º) Hemos demostrado que los botones gustativos de la papila circunvalada central de la rata maduran durante la segunda semana de vida postnatal. Los cambios fundamentales observados durante esta semana consisten en:

a) un aumento del número y extensión de las fibras nerviosas intracorporculares.

b) aparición de una actividad ATPásica circunscrita exclusivamente a los botones gustativos.

c) un aumento numérico de las células intracorporculares intermedias y claras.

d) aparición de una cápsula bien definida.

Las coloraciones para AChE revelaron abundantes fibras y terminaciones en el interior de los botones gustativos de la segunda semana. En algunos casos, estas fibras ascienden hasta la proximidad del poro apical, pero la mayoría de las expansiones correspondientes a las terminaciones, se mantienen en el interior de la mitad basal. El sistema de inervación intracorporcular AChE positivo aparecía muy poco desarrollado en el animal de primera semana. Esto no indica que durante la primera semana no existan fibras intraepiteliales AChE negativas ya que nuestras observaciones con microscopía electrónica permitieron detectar estructuras de este tipo. Por otra parte, Paran y Mattern (1975), mostraron que la reacción de AChE a nivel de microscopía electrónica en la papila circunvalada central de la rata,

da resultados positivos en algunas fibras intercorpúsculares mientras que otras se mantienen sin teñir.

Uno de los cambios más notables observados en la papila de segunda semana, es la aparición de actividad ATPásica a nivel de las células gustativas. El análisis de estos botones teñidos positivamente, mostró que las células capsulares dan una reacción negativa o débilmente positiva; el resto del epitelio resultó absolutamente negativo. Es probable que esta escasa tinción de las células capsulares, cuando aparece, sea debida a una difusión del producto de reacción. La falta de reactividad a la ATPasa en los botones de primera semana podría ser explicada de la siguiente manera: las fibras nerviosas ingresarían al epitelio desprovistas de sus envolturas gliales. Estas fibras intraepiteliales podrían dar lugar a un reordenamiento localizado de las células epiteliales originándose una cápsula más o menos definida que demarca así el sitio en que, posteriormente, se desarrollarán las células gustativas. Más adelante, las células de Schwann subepiteliales podrían ingresar a esta cápsula siguiendo los tractos nerviosos para diferenciarse inmediatamente como células gustativas. Con la técnica utilizada no fue posible determinar cual o cuales de los tres tipos celulares intracorpúsculares da reacción positiva. Es lógico suponer, sin embargo, que la actividad ATPásica asiente en los tres tipos celulares obsevados en los especímenes de la segunda semana. Existe una buena cantidad de células oscuras subcapsulares, si éstas dieran reacción negativa, esta reacción sería fácilmente

detectable. Por otra parte, las células intermedias y claras son lo suficientemente voluminosas como para ser identificadas aún en ausencia de reacción.

Todos los tipos celulares de los botones son más abundantes en la segunda semana que en la primera, pero las células oscuras son las más numerosas. La proporción de claras e intermedias es ligeramente favorable a las segundas. En los botones de segunda semana, por lo tanto, no solo maduran las células que habían ya ingresado al proceso de diferenciación, sino que continúa la entrada de células al sistema.

El análisis con microscopía electrónica de estos botones, reveló la aparición de una polarización morfológica a nivel de las células claras e intermedias, localizándose todo el aparato de síntesis proteica en el citoplasma apical. En relación con este complejo, aparecen, además, vacuolas grandes con un contenido denso que se acumula en el citoplasma cercano a las microvellosidades apicales. La diferencia ultraestructural fundamental entre células intermedias y claras de la segunda semana, consiste en la existencia de un mayor número de componentes del retículo endoplásmico en las células intermedias y de un mayor número de vesículas apicales en las claras.

Los resultados obtenidos de la observación de los botones gustativos de la segunda semana, plantean también una serie de interrogantes:

a) ¿Que significa la presencia de células intermedias y claras en los botones gustativos de la segunda semana?.

Indudablemente esas células representan estadios avanzados del proceso de diferenciación iniciado durante la primera semana. Ambos tipos de células presentan contactos con fibras nerviosas. En estos contactos, aparecen acúmulos de vesículas en la porción celular o presináptica y también en las terminaciones postsinápticas intracorpúsculares. Ambos tipos de células presentan también un contorno muy irregular y terminan en el polo apical en un sistema de microvellosidades que son, al parecer, idénticas entre sí. A nivel basal, ambas células tienen prolongaciones globulosas en contacto con terminaciones nerviosas o bien, en contacto directo con la lámina basal del epitelio. Existe, además, una transición gradual entre células intermedias y claras. Estos hallazgos morfológicos permiten afirmar que las células claras e intermedias representan diferentes estadios evolutivos de un mismo tipo celular.

b) ¿Que representan las células oscuras en los botones gustativos de la segunda semana?. Si bien en la mayoría de los trabajos consignados anteriormente las células oscuras serían los receptores gustativos, nuestras observaciones indican lo contrario. Estas células se encuentran en contacto directo con las fibras nerviosas intracorpúsculares, pero estos contactos no son especializados. La relación entre células oscuras y fibras nerviosas es idéntica a la que presentan las fibras nerviosas y las células de Schwann en cualquier nervio periférico (Geren y Schmitt, 1955; Schmitt, 1958).

Las células oscuras tienen prolongaciones citoplasmá

ticas lamelares que rodean a las fibras nerviosas, no interponiéndose entre ambas estructuras, membrana basal alguna. Por otra parte, algunas células oscuras presentan una prolongación citoplasmática que sale del botón a través del poro basal para quedar en contacto con los haces nerviosos subepiteliales. Estas prolongaciones que salen de esta forma del botón, quedan recubiertas por una lámina basal similar a la que rodea a las células de Schwann vecinas. Estas observaciones sugieren que las células gustativas pueden tener un origen glial. Las células oscuras podrían representar células de Schwann que en el transcurso de la segunda semana se van diferenciando en células intermedias y claras. La presencia de células oscuras en los botones ya diferenciados y quizá fisiológicamente activos, representaría, por una parte, un componente arquitectónico con funciones de sostén para el resto de las células y para las fibras nerviosas intracorpúsculares (son bien conocidas las funciones arquitectónicas de las células gliales en general) (De Robertis y Gerschenfeld, 1961), y al mismo tiempo cumplirían funciones de reserva, ya que podrían diferenciarse en los otros tipos celulares y posibilitar así el recambio fisiológico.

3º) La diferenciación de los botones gustativos en la papila circunvalada central de la rata, continúa durante la tercera semana:

- a) el número de células de cada botón aumenta con respecto al de segunda semana.
- b) los porcentajes relativos de los tres tipos celula-

res sufre modificaciones importantes con respecto al animal de segunda semana.

c) la estructura y ultraestructura de las células intermedias y claras cambia considerablemente.

d) la actividad ATPásica de los botones y la cantidad de fibras intracorpúsculares no se modifica con respecto al animal de segunda semana.

El cambio más significativo registrado en los botones de tercera semana, es un incremento notable en el número de células intermedias. La figura 5.2-1, muestra un incremento aproximadamente lineal de estas células y también un aumento de las células oscuras durante la tercera semana. Estos detalles parecen fundamentales para interpretar la diferenciación de los botones gustativos.

Otro cambio importante observado durante la tercera semana afecta a las células claras e intermedias. Estas se distinguen de sus homólogas de la segunda semana, por presentar un contorno mucho más regular. Las células intermedias muestran, además, una gran proliferación del retículo endoplásmico liso y las células claras un notable incremento de sus poblaciones vesiculares. Estas vesículas son de origen heterogéneo. Algunas parecen proceder de porciones dilatadas del aparato de Golgi, otras representarían elementos también dilatados del retículo endoplásmico, otras, que se acumulan en el poro apical, tienen aspecto lisosómico.

Nuevamente se desprenden de estas observaciones algunos interrogantes:

a) ¿Cual es el significado de las variaciones numéricas de las células intermedias y de las células oscuras?. El incremento lineal del número de células intermedias que se produce durante las tres primeras semanas, indica que estas células representan la etapa final de la diferenciación. Esto es apoyado, además, por el hecho de que las células intermedias son las que tienen mayor cantidad y variedad de organoides y un núcleo constituido fundamentalmente por cromatina laxa, con uno o más nucleolos prominentes.

Las células claras presentan en su interior evidencias de procesos degenerativos representados por la vacuolización de diversos organoides, tumefacción de mitocondrias y un incremento del contenido lisosómico. Las células claras representarían, por lo tanto, células envejecidas. Si consideramos que la vida media de las células gustativas es de alrededor de 10 días (Beidler y Smallman, 1965), es razonable suponer que las células claras de los botones de tercera semana representan las primeras células envejecidas o degenerativas que aparecen en los botones de la papila circunvalada central de la rata. Las células claras de la segunda semana no presentan aún detalles ultraestructurales que puedan ser interpretados como parte de un proceso degenerativo, esas mismas células serían las que están próximas a desaparecer durante la tercera semana.

El inicio de un recambio celular representa, evidentemente, un elemento más en la maduración del sistema y el establecimiento de un equilibrio entre procesos dife-

renciadores y procesos involutivos.

b) ¿Que significan los cambios cuantitativos posteriores a la tercera semana?. Si bien hemos observado que durante la tercera semana se realiza un proceso de maduración de los botones gustativos, éstos difieren considerablemente de los observados en el animal adulto. Después de la tercera semana, los botones presentan mayor cantidad de células oscuras, una gran disminución del número de células intermedias y una ligera disminución de la población total. Esta última diferencia no es significativa. Estos datos indican que durante la tercera semana no se ha alcanzado aún el equilibrio de recambio celular. La disminución en el número de células intermedias en el animal adulto, sugiere la existencia de factores reguladores de esta etapa de la diferenciación, los cuales no estarían presentes, por lo menos bajo un punto de vista fisiológico, en el animal de tercera semana. Estos hipotéticos factores actuarían en equilibrio con los factores de origen neural.

El análisis evolutivo de los botones gustativos de la papila circunvalada central en las primeras semanas de vida postnatal de la rata, han permitido poner en duda la hipótesis sobre el origen epitelial de las células gustativas y ha resultado útil para precisar, no solo las características, sino también el sentido del proceso de diferenciación de las células gustativas. Esto es ilustrado por la figura 6.1-1 y constituye un aporte original al conocimiento de este proceso.

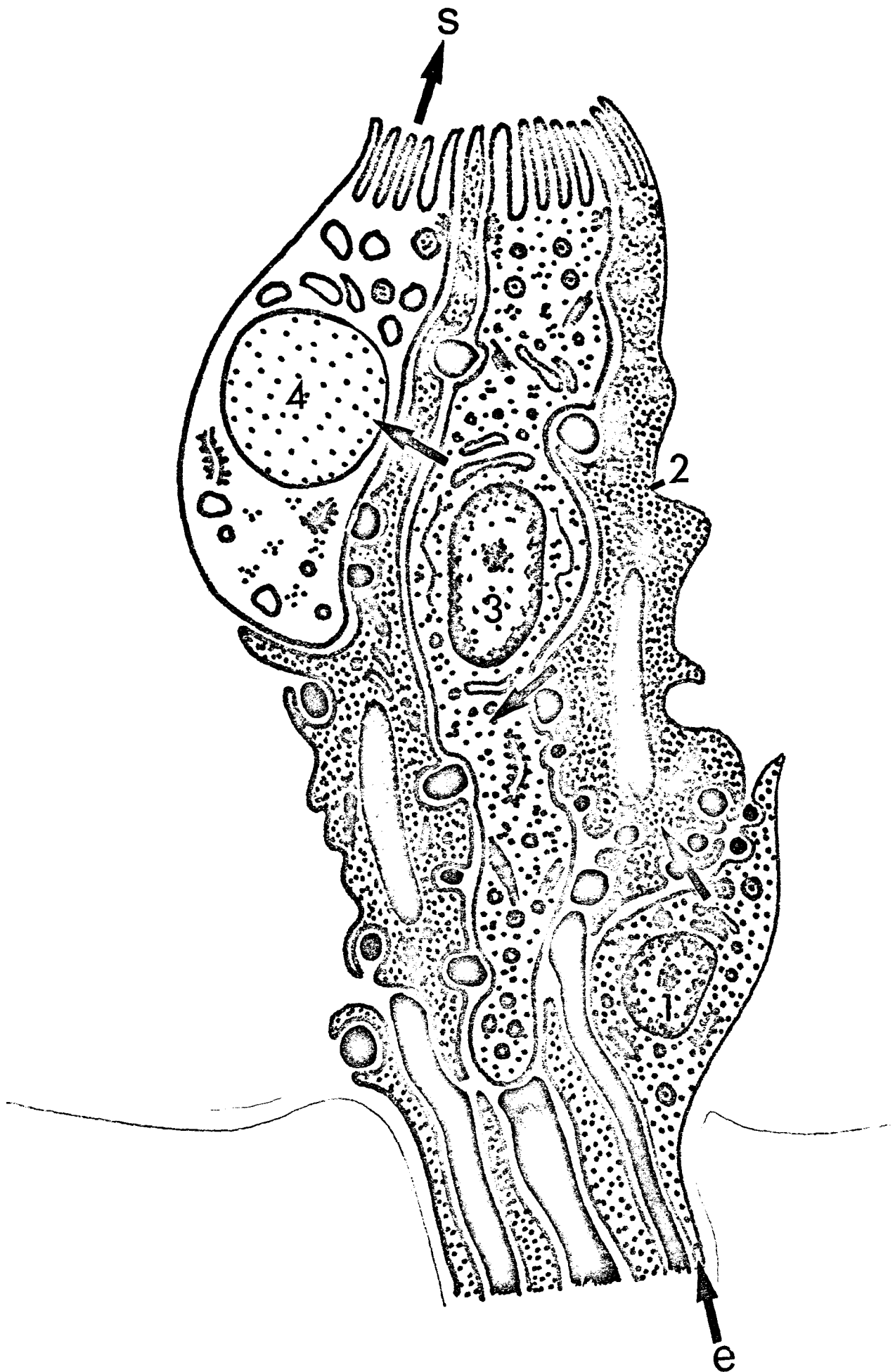


Fig. 6.1-1.

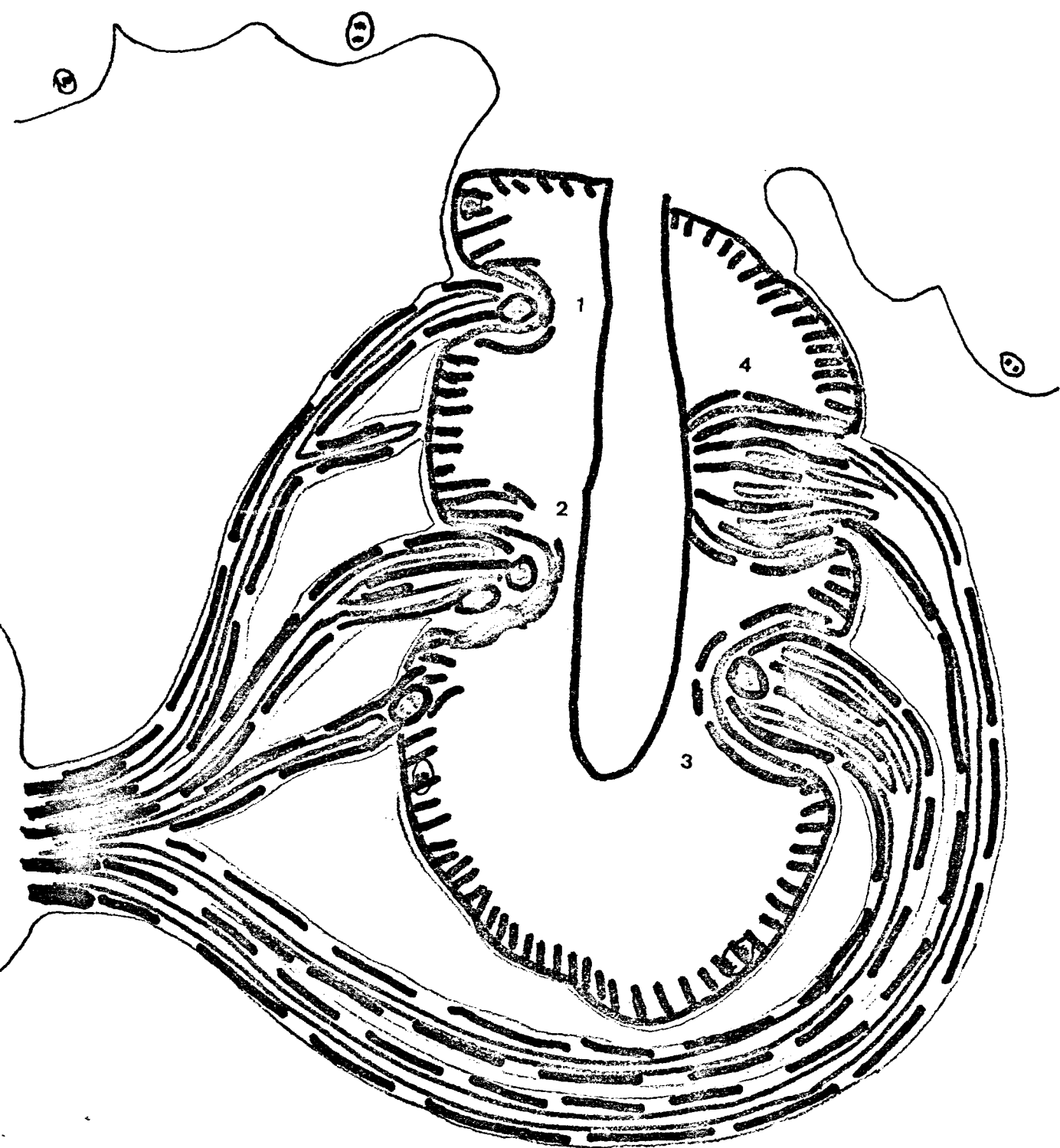


Fig. 6.1-2.

Fig. 6.1-1.- Diferenciación, maduración y recambio celular en los botones gustativos. Una célula de probable origen glial (1), entra en el sistema de diferenciación (e). Esta célula se diferencia en una célula oscura (2), la cual madura a célula intermedia (3), que luego degenera para transformarse en una célula clara (4) y, finalmente, sale del sistema (s). Todas las células están en contacto con fibras nerviosas que en el esquema aparecen pintadas de negro.

Fig. 6.1-2.- Representación esquemática del epitelio gustativo y del probable mecanismo de formación de los botones a partir de las células de Schwann que acompañan a las fibras nerviosas (1, 2, 3 y 4).

6.2.- CARACTERISTICAS DE LA REGENERACION DE LOS BOTONES GUSTATIVOS.

En nuestros experimentos sobre regeneración papilar se ha ideado un nuevo método de abordaje para el estudio de la diferenciación de los botones gustativos en la papila circunvalada central de la rata adulta.

Los experimentos realizados hasta ahora han revelado que los botones gustativos de esta formación, son tróficamente dependientes de ambos nervios glossofaríngeos (Sandmeyer, 1895; Meyer, 1897) y que las fibras nerviosas preterminales gustativas de estos nervios, se superponen a nivel de la papila central (Vastarini-Cresi, 1915). Al lesionar estos nervios, los botones desaparecen por completo en un plazo no mayor de 15 días. Los experimentos de Donegani y Filógamo (1971), han demostrado, por otra parte, que la inyección de colchicina en el nervio glossofaríngeo, produce un efecto idéntico al de la denervación. Se conoce por lo tanto que: a) los botones gustativos son neurodependientes, b) pueden rediferenciarse cuando se reinerva el epitelio gustativo y c) aparentemente, la diferenciación de los botones gustativos es inducida y mantenida por algún factor transportado distalmente por el axoplasma de las fibras sensitivas. Esto último no ha sido, sin embargo, suficientemente demostrado.

Nuestros experimentos sobre regeneración papilar corroboran estas conclusiones y muestran, además, que la papila completa puede regenerar después de su extirpación

total. Los detalles estructurales del proceso de diferen
ciación de la papila neoformada han sido descritos por
Fernández (1977). Nos ocuparemos solamente de todos aquel
los aspectos relacionados con la diferenciación de los
nuevos botones gustativos.

Nuestras observaciones han demostrado que la papila
es capaz de regenerarse muy rápidamente, ya que aparece
como una estructura bien diferenciada en los animales sal
crificados tan solo 5 ó 6 días después de la depapilación.
La diferenciación de los botones en el epitelio gustativo
es, en cambio, un proceso que requiere intervalos de tiem
po más prolongados. En un experimento de 6 días se observ
aron botones inmaduros similares a los del animal normal
de 3 ó 4 días de edad, pero botones gustativos típicos y
abundantes, aparecieron recién en las papilas neoformadas
de los días 13 y 16 posteriores a la operación. De los 9
animales utilizados en los experimentos, solo en dos casos
pudo constatarse que la depapilación no fue total y se mant
uvieron parcial o totalmente intactos los componentes del
ganglio papilar.

Las papilas neoformadas presentaron en su mayoría un
aspecto asimétrico, constatándose que fue igualmente asim
étrica la reinervación del epitelio gustativo. Se comprob
ó la existencia de una relación directa entre el número
de botones gustativos y el número de fibras AChE positiv
as que inerva el epitelio. La mayor parte de los botones
aparecieron en las zonas profusamente inervadas.

Al igual que en los animales recién nacidos, se ob-

servó que las papilas obtenidas 5 ó 6 días después de la lesión, se encuentran reinervadas pero no contienen botones típicos. Los botones aparecen en la papila regenerada de seis días, son ATPasa negativos y carecen de poro apical. La actividad ATPásica y el poro apical aparecen más tardíamente. Nuevamente, en este caso, la coloración para ATPasa resultó un indicador efectivo para el análisis de la diferenciación de las células gustativas.

La diferenciación de los botones gustativos en las papilas neoformadas, sigue un modelo similar al del desarrollo postnatal de estas estructuras. En los animales de papilados de tres días no fueron observados botones gustativos. Normalmente, la aparición de los primeros botones primitivos lleva aproximadamente tres días desde el momento del nacimiento. En el animal de seis días se observaron ya botones inmaduros comparables a los del animal intacto de primera semana. La aparición de botones gustativos inmaduros en las papilas neoformadas requiere, por lo tanto, un tiempo aproximado de 3 días desde el momento en que se va completando el cierre de la herida operatoria y se van reestructurando los surcos y la inervación de los mismos.

Es interesante mencionar, finalmente, que la neoformación de los botones no se acompaña de números significativos de figuras mitóticas a nivel del epitelio gustativo. Esta observación no apoya, por consiguiente, la posibilidad de que los botones gustativos sean el producto de divisiones mitóticas de las células del epitelio de cubierta lingual (Gräberg, 1898; de Lorenzo, 1958; Beidler y

Smallman, 1965). De acuerdo a esta teoría, una o ambas células hijas entrarían en el proceso de diferenciación bajo el comando de las fibras nerviosas sensitivas. Si tal fuera el caso, un proceso que lleve a la rediferenciación simultánea de nuevos botones gustativos, como el que nos muestran los experimentos de regeneración, sería lógico observar un incremento en la actividad mitótica del epitelio, pero éste no fue detectado.

Estas observaciones han demostrado que la regeneración de los botones gustativos secundaria a la depapilación, se realiza por medio de un mecanismo idéntico al de los animales de las primeras semanas de vida postnatal. El tiempo necesario para que esta diferenciación se realice, parece ser también similar. Muestra, además, que la diferenciación de los botones gustativos requiere, por una parte, un sistema de inervación y, por otra, un epitelio específico representado por la desembocadura de los conductos glandulares serosos. Esto ha sido postulado recientemente por Fernández (1977). El número de botones gustativos regenerados en este epitelio, será proporcional al número de fibras neoformadas que lo inervan.

6.3.- CARACTERISTICAS DE LA DIFERENCIACION DE LOS BOTONES GUSTATIVOS EN PAPILAS INJERTADAS.

Una vez analizado el proceso de regeneración papilar consecutivo a la depapilación quirúrgica, hemos estudiado, mediante los experimentos de autoinjerto de la papila en la superficie dorso lateral de la lengua, 1º) las características de la regeneración de la papila en el sitio primitivo de implantación y 2º) la evolución de los botones gustativos en la papila injertada.

De acuerdo a lo descrito en material y métodos, las papilas extirpadas permanecieron conectadas siempre a la superficie lingual mediante un pedículo dorsal amplio. En todos los casos se realizó una incisión suficientemente profunda como para permitir que los vasos sanguíneos, parte de las glándulas serosas asociadas y parte de las fibras papilares de los nervios glossofaríngeos permanecieran incluidas en el interior del injerto. Con esto, hemos tratado de mantener, dentro de lo posible, todas las condiciones necesarias para la supervivencia de estas papilas.

Las observaciones demostraron que las papilas injertadas se desdiferencian estructuralmente pero mantienen, por lo menos, algunos botones gustativos intactos, aún en las preparaciones obtenidas 40 días después de la operación. En los sitios en que estas papilas fueron extirpadas, hemos observado, por otra parte, la aparición de papilas neoformadas, en su mayoría asimétricas, similares a las que hemos comentado en la sección 6.2, pero con un número de

botones gustativos sensiblemente menor.

El hecho de que tanto los injertos como las papilas neoformadas contengan botones gustativos, demuestra que ambas estructuras se encuentran inervadas por fibras sensitivas. Las fibras que inervan el injerto son aquellas que fueron trasladadas con el mismo, y las que lograron sobrevivir a la manipulación quirúrgica, a su nueva localización y a los procesos inflamatorios y cicatriciales consecutivos. Demuestra también, que otra parte de las fibras nerviosas fue lesionada en el momento de la extirpación y reinervó posteriormente a las papilas regeneradas. Ambas papilas están inervadas, por lo tanto, por un número de fibras nerviosas inferior a lo normal.

Hemos visto que las papilas regeneradas de los experimentos de autoinjerto presentaron botones gustativos menos numerosos que los observados en los experimentos de regeneración. Más aún, en una de las papilas regeneradas de 14 días no fue posible distinguir botones gustativos neoformados. Casos como éste no fueron detectados en los experimentos de regeneración, en los cuales todo el material obtenido con más de 6 días de intervalo después de la extirpación, presentó abundantes botones.

En los experimentos de regeneración vimos que la reinervación de los surcos era, frecuentemente, asimétrica y que existía un paralelismo entre el número de fibras nerviosas subepiteliales y el número de botones gustativos del epitelio. En los experimentos que ahora comentamos, se corrobora esta conclusión. La escasez de botones gus-

tativos en las papilas regeneradas de los experimentos de autoinjerto, se debe a la disminución del número de fibras nerviosas disponibles para su reinervación. La ramificación de las fibras remanentes a nivel del plexo subepitelial, no ha logrado compensar la disminución del número total de fibras primarias del sistema. Este hecho parece estar relacionado con las características intrínsecas de la función trófica del nervio glossofaríngeo. Sugiere que sus fibras transportan cantidades mínimas de los correspondientes factores tróficos o diferenciadores. Desde el momento en que los factores tróficos proceden directa o indirectamente del cuerpo neuronal (Gutmann, 1964; Guth, 1969; Lentz, 1971, 1972; Albuquerque y col., 1972), una mayor ramificación de las fibras preterminales no puede compensar la disminución en el número de fibras primarias. Este hecho no afecta, sin embargo, la neoformación de la papila ni el desarrollo del epitelio gustativo correspondiente.

Los experimentos realizados por otros autores mediante sección o colchicinización (Iwayama y Nada, 1969; Donegani y Filógamo, 1971; Vij y col., 1972), han demostrado claramente que los botones gustativos no son capaces de sobrevivir más allá de los 14 días. Nuestros injertos observados con intervalos comprendidos entre 14 y 40 días, presentaron en su mayor parte, botones, si bien escasos y pequeños, constituidos por células de estructura más o menos normal. Esto demuestra que han sido trasladadas junto al injerto algunas fibras intactas de los nervios glosofa

ríngenos. El mantenimiento de estos botones demuestra que se mantiene intacto también su sistema de inervación.

Uno de los animales sacrificados 14 días después de la operación, presentó una ausencia de botones en el epitelio del injerto; el mismo animal mostró una papila regenerada también carente de botones. Este caso aislado nos sugiere que la lesión operatoria ha destruido el sistema de inervación, por lo menos en la medida necesaria para que la rediferenciación de las estructuras gustativas no pueda ya acontecer en la papila regenerada ni mantenerse a nivel del injerto. Apoya también el concepto de una independencia entre la regeneración papilar y los factores tróficos del nervio glossofaríngeo.

La observación de botones gustativos intactos en los injertos de 40 días resulta particularmente interesante. Indica que el proceso básico de diferenciación ha continuado durante todo este tiempo, ya que la población celular en cada uno de los botones gustativos remanentes ha debido renovarse entre 3 y 4 veces.

Las secciones de todos los injertos, incluyendo al de 40 días, mostraron que las glándulas de von Ebner trasplantadas, sufren cambios histológicos importantes tales como atrofia de los acinos y disminución de la altura del epitelio de los conductos glandulares. Esto sugiere la presencia de alteraciones funcionales en el ciclo secretor de estas glándulas, lo cual puede estar relacionado con la desdiferenciación del surco papilar. Estas alteraciones no han impedido, sin embargo, la continuación del pro

ceso de diferenciación a nivel de los botones.

El análisis comparativo de los botones que se mantienen en los injertos y los botones regenerados de la papila neoformada mostró que: a) los botones del injerto contienen muy escasas células especialmente de las del tipo oscuro y b) los botones regenerados de la papila neoformada presentan una proporción normal de células oscuras, intermedias y claras. De acuerdo a las observaciones comentadas en las secciones 6.1 y 6.2, las células oscuras representan la iniciación del proceso de diferenciación que venimos estudiando. Una disminución en el número de células oscuras (células troncales) lleva necesariamente a una disminución en el número de células intermedias y claras, dando lugar a botones más pequeños, con una población celular inferior a lo normal. Es probable que la posición anómala que estas papilas han pasado a ocupar sobre la superficie de la lengua, juegue algún papel en estas alteraciones de la primera etapa del proceso de diferenciación.

Es necesario mencionar, finalmente, que el injerto de 60 días careció totalmente de botones gustativos. Un solo caso negativo es insuficiente, sin embargo, para establecer conclusiones. Este injerto, al igual que el de 14 días que comentáramos anteriormente, puede haber incluido fibras gustativas demasiado escasas para mantener la estructura de los botones gustativos.

El análisis de los injertos pediculados de la papila ha completado los hallazgos comentados en la sección precedente y ha demostrado que: 1º) que la papila circunvalada

de la rata puede ser transplantada sin que ocurra una dege
neración completa de los botones gustativos siempre que
ésta mantenga un sistema de inervación suficiente, 2º) a
pesar de que los botones gustativos de la papila injerta-
da se encuentran expuestos a un medio distinto del normal,
éstos se mantienen estructuralmente intactos durante lar-
gos periodos de tiempo y 3º) la regeneración papilar no re
sultó afectada por la presencia de una papila injertada,
pero , y secundariamente a una distribución de las fibras
nerviosas entre dos papilas, el número de botones disminu-
ye en ambas. En cuanto a la disminución en el número de las
células constitutivas de los botones en las papilas injer
tadas, esta alteración estaría relacionada con una dismi
nución en el número de células oscuras disponibles. Es po
sible que el efecto diferenciador del nervio sobre las cé
lulas gustativas se realice exclusivamente sobre esta pri
mera etapa del proceso. Los experimentos que comentaremos
a continuación, han permitido obtener más información con
respecto a esta hipótesis.

6.4.- CARACTERISTICAS DE LA INHIBICION DE LA DIFERENCIACION DE LOS BOTONES GUSTATIVOS.

Se ha demostrado que los fármacos antimitóticos producen, además de una inhibición del proceso de división celular, un bloqueo parcial del transporte axoplásmico, desde diferenciación o degeneración de las estructuras neurodependientes correspondientes y un bloqueo total de la eliminación de productos secretorios celulares.

El efecto antimitótico de la colchicina, vinblastina, vincristina y citochalasina ha sido estudiado en detalle por numerosos autores (Malawista, 1965 ; Johnson y col., 1960; Palmer y col., 1960; Cutts, 1961; George y col., 1965; Krishan y col., 1971).

Estos fármacos se acoplan selectivamente al aparato mitótico, en particular a los microtúbulos de esta estructura (Boris y Taylor, 1967), deteniendo la mitosis en estado de metafase. En algunas células, los antimitóticos pueden inducir la formación de varios núcleos (células multinucleadas) e inhibición de la citocinesis (Krishan, 1971).

Se ha demostrado que la colchicina y vinblastina inhiben las fases rápida y lenta del transporte axoplásmico (Sjöstrand y col., 1970; Fernández y col., 1970). Estos fármacos se acoplan de forma reversible a los microtúbulos neuronales (Boris y Taylor, 1967; Malawista y col., 1968), produciendo su depolimerización (Wisniewsky y col., 1968; Banks y col., 1971) o bien su desactivación (Fernández y col., 1970; Rodríguez-Echandía y col., 1973). La colchicina in-

yectada en nervio periférico en concentración 10 mM, produce la detención del transporte de organoides citoplasmáticos y factores tróficos musculares (Albuquerque y col., 1972; Rodríguez-Echandía y col., 1973; Fernández, 1973). En estas concentraciones, la colchicina no bloquea el transporte de agua y de materiales necesarios para el mantenimiento estructural y funcional del segmento de nervio distal al sitio de la inyección (Fernández y col., 1970; Rodríguez-Echandía y col., 1973), por lo que no produce efectos degenerativos. Utilizando altas concentraciones de vinblastina o colchicina se ha podido observar degeneración de las fibras nerviosas y consecuentemente trastornos tróficos en las estructuras inervadas.

Es conocido que la sección de un nervio o bien la inyección de fármacos antimitóticos, da origen a fenómenos degenerativos en las estructuras inervadas cuando éstas son neurodependientes. Estos fenómenos aparecen tanto más tardíamente cuanto mayor sea la longitud del segmento de nervio distal al sitio de la lesión o de la inyección (Luco y Eyzaguirre, 1955). Esto indica que las sustancias tróficas acumuladas en este segmento de nervio, continúan migrando distalmente hacia la estructura inervada con lo cual el trofismo de la misma, se mantiene hasta que se agote este material o bien sobrevengan fenómenos degenerativos precoces en la fibra nerviosa afectada (Dählstrom, 1967; Kappeller y Mayor, 1967; Banks y col., 1969).

El bloqueo de los efectos tróficos neurales producido por los alcaloides antimitóticos, está directamente re

lacionado con la capacidad de estas drogas para bloquear la liberación de productos secretorios en una variedad de tipos celulares tales como células exocrinas (Lacy y col., 1968), células de la médula adrenal y terminaciones nerviosas adrenérgicas (Keen y Livingston, 1970; Poisner y Bernstein, 1971), terminaciones neuroendocrinas (Boudier y col., 1971; Norström y col., 1971; Rodríguez-Echandía y col., 1974, 1977) y otras.

La inyección de colchicina en el nervio glossofaríngeo del conejo (Donegani y Filógamo, 1971) produce una desdiferenciación de los botones gustativos de la papila circunvalada central, en la porción correspondiente a la zona de influencia del nervio inyectado. Este efecto fue atribuído a la interrupción del transporte axoplásmico de los factores tróficos o diferenciadores que inducen la formación y el mantenimiento de los botones. Sin embargo, no fueron analizados en este trabajo los posibles efectos tóxicos de la inyección de colchicina, ni fue posible detectar alteraciones a nivel de las fibras del plexo papilar ya que las preparaciones fueron examinadas principalmente con microscopía óptica. Con los datos aportados por Donegani y Filógamo (1971), queda en pie la posibilidad de que el efecto desdiferenciador de la colchicina no sea debido a una interrupción del transporte de factores tróficos sino a la degeneración de las fibras del plexo subpapilar. La dosis utilizada en esos experimentos fue lo suficientemente alta como para sospechar este efecto. La colchicina en altas concentraciones ejerce efectos múlti

ples. Es capaz de bloquear la transmisión sináptica inhibiendo la secreción de neurotransmisores (Perisic y Cuenod, 1972); puede, además, ejercer un efecto antagónico sobre el ATP (Lang y col., 1951) y afectar a la síntesis del DNA (Gustavson, 1968).

Teniendo en cuenta los numerosos y diferentes efectos que la colchicina puede tener sobre las células, resulta a veces complejo el tratar de adscribir su acción al bloqueo de una función determinada..

En nuestras preparaciones tratadas con colchicina, la droga actuó directamente sobre las fibras y terminaciones del plexo papilar, así como también sobre las células diferenciadas de los botones gustativos y las células intercorpúsculares del epitelio papilar. Es conocido que el efecto antimitótico de la colchicina es rápidamente reversible, no así su efecto bloqueador sobre el transporte axoplásmico y la liberación de factores en las terminaciones nerviosas (Sjöstrand y col., 1970; Albuquerque y col., 1972; Rodríguez-Echandía y col., 1977).

Los animales que recibieron una inyección intrapapilar única y fueron sacrificados 5 días después, mostraron que:

- 1) los botones gustativos se mantienen en números similares a lo normal.
- 2) la reacción de AChE a nivel de las fibras del plexo papilar disminuyó considerablemente.
- 3) la reacción de ATPasa no se modifica.

Estas observaciones indican que el efecto antimitotico

co de la droga no ha sido lo suficientemente largo o bien lo suficientemente intenso como para producir fenómenos degenerativos a nivel de las estructuras gustativas, lo que demuestra que la dosis empleada no es tóxica. El efecto observado sobre la concentración de AChE en las fibras del plexo papilar, parece ser debido a un bloqueo del transporte axoplásmico de este enzima a lo largo de las ramificaciones preterminales. Esta interpretación es apoyada por la observación de un aumento de la reacción en las neuronas del ganglio papilar. Este cambio se debe, indudablemente, a que la AChE sintetizada en los ribosomas de los cuerpos neuronales (Kreutzberg y col., 1974) se acumula en los sitios de síntesis, ante la imposibilidad de migrar hacia las terminaciones axónica y dendríticas.

Cuando la colchicina es inyectada localmente en un nervio, se produce una zona de bloqueo del transporte, circunscrita al sitio de la inyección, la cual se extiende aproximadamente hasta 1 mm en sentido proximal y distal. Por encima y por debajo de esta zona el transporte continúa normalmente (Rodríguez-Echandía y col., 1973). Nuestras inyecciones intrapapilares han afectado indudablemente al plexo papilar completo y su efecto se ha extendido proximalmente por las ramas correspondientes de ambos nervios glossofaríngeos, ya que la papila circunvalada central completa tiene aproximadamente 1 mm³. El transporte axoplásmico debe haberse bloqueado, entonces, a todo lo largo de las fibras del plexo papilar. También debe haberse bloqueado la liberación de factores neurales

a nivel de las terminaciones gustativas y la endocitosis a nivel de todos los tipos celulares de la zona, ya que este proceso es también sensible a los antimitóticos (Wang, 1972). La disminución en la reacción de la AChE es una expresión de este bloqueo, ya que tal enzima es transportada distalmente por la fibra nerviosa (Kreutzberg y col., 1973; Kreutzberg y Toth, 1974). La ausencia de alteraciones tróficas en las células gustativas a los 5 días de la inyección de colchicina, puede indicar que: a) la droga no ha afectado el transporte ni la liberación de los factores tróficos o b) las células gustativas ya diferenciadas no requieren, o bien requieren muy pequeña cantidad, de factores tróficos para el mantenimiento de su estructura. La primera de estas alternativas es poco probable, ya que la colchicina inyectada localmente bloquea el transporte de factores tróficos en nervios motores (Fernández, 1973). Con respecto a la segunda, parece razonable suponer que las células gustativas que han ingresado ya al proceso de diferenciación gustativo, no requieran ya nuevos factores tróficos para transformarse en células intermedias y claras. Si tal fuera el caso, el comando neural de la diferenciación de las células gustativas, se ejercería solamente a través del primer estadio de este proceso. Esto fue ya sugerido por los experimentos de la sección precedente.

El bloqueo inducido por la colchicina en otros sistemas tiene una duración de 20 a 30 días (Fernández, 1973), por lo que podemos suponer que en nuestros experimentos

de 5 a 15 días de intervalo, no han llegado aún a la célula nuevos factores diferenciadores. El hecho de que el número de botones se mantuvo normal, no contradice esta especulación, ya que la vida media de las células de este sistema es de 10 días. Desafortunadamente, las técnicas utilizadas para el examen de estas preparaciones no han permitido detectar posibles alteraciones cuantitativas o cualitativas en los tres tipos celulares de los botones gustativos.

Con el objeto de completar estas observaciones y ampliar las conclusiones, se realizaron los experimentos de doble inyección de colchicina. En estos casos, la papila fue inyectada dos veces con mayor dosis de colchicina a intervalos de 5 días. En este caso, los efectos observados fueron variables. El efecto más constante consistió en una disminución de la AChE del sistema; esto fue observado en todos los animales. También fue evidenciable en estos experimentos un aumento de la AChE en las neuronas del ganglio papilar. La reacción de ATPasa, por el contrario, dió resultados variables. En dos animales se observó una desaparición completa de la reacción a nivel del epitelio gustativo, lo que, como ya hemos visto, indica desdiferenciación o degeneración de los botones. En otros dos animales, el número de botones ATPasa positivos disminuyó, pero fue posible evidenciar la presencia de botones resistentes al tratamiento. La reacción fue siempre positiva en el componente neural del sistema.

La variabilidad de resultados después de la doble in

yección local de colchicina, está indudablemente relacionada con las condiciones técnicas en que fueron desarrollados los experimentos. Las inyecciones intrapapilares no pueden ser repetidas exactamente en las mismas condiciones. Aún cuando el volumen de la inyección sea constante, la cantidad de solvente y droga que llega a contactar en forma efectiva con el epitelio gustativo, varía en uno y otro caso. Un razonamiento similar ha sido aplicado para explicar la variabilidad de la respuesta a la inyección de colchicina en otros sistemas (Rodríguez-Echandía y col., 1973). Es razonable suponer que los animales más severamente afectados por la doble inyección fueron aquellos en los que una mayor cantidad de colchicina fue incorporada al sistema papilar. En este sistema, la colchicina ha actuado sobre el componente neural, el componente epitelial y también sobre células especiales del tejido conectivo, tales como células plasmáticas y células cebadas.

Las preparaciones obtenidas en cortes de Epón, revelaron también una variabilidad en los resultados. En dos casos se observó una desaparición casi completa en el número de botones; en cuatro casos se observó una disminución en el número de botones, pero los botones remanentes presentaron alteraciones a nivel celular.

El estudio, con microscopía electrónica, del material tratado con dos inyecciones de colchicina, reveló una ausencia completa de botones gustativos. Las células del correspondiente epitelio aparecen absolutamente normales y lo mismo ocurre con los diferentes tipos celulares del co

nectivo subepitelial. Las fibras nerviosas, tanto las intraepiteliales como las del plexo papilar, presentaron una estructura normal aunque llamó la atención la presencia, en la mayoría de estas fibras, de vesículas granuladas de tamaño heterogéneo. En conclusión, la disminución o desaparición de los botones gustativos no fue acompañada, en nuestro material experimental, de alteraciones degenerativas aparentes en otros componentes del sistema.

En las secciones 6.1 y 6.2 se determinó que las células oscuras intracorpúsculares representan el primer estadio en la diferenciación de las células gustativas. Una disminución en el número de estas células puede ser explicada de acuerdo con las siguientes alternativas: a) disminución en el número de células que ingresan en el proceso de diferenciación y b) aumento de la velocidad de diferenciación hacia células intermedias. Con respecto a la primera de estas alternativas es razonable suponer que la colchicina bloquee el primer paso del proceso de diferenciación. En el caso de que las células oscuras provengan de divisiones mitóticas de células epiteliales, tales divisiones han sido inhibidas por la droga. En el caso, más probable, de que las células gustativas troncales deriven de células de Schwann, serían necesarios, no solo procesos mitóticos, sino también procesos migratorios celulares para que esta diferenciación pudiera iniciarse. Estos últimos procesos, al igual que los primeros, son bloqueados por los alcaloides antimitóticos (Gicquaud y Couillard, 1972; Krishan y Whitlock, 1972; Luchtel y col.,

1976). Con respecto a la segunda alternativa, es muy improbable que esta droga acelere la continuación y terminación de este proceso ya que, en otros sistemas, no solo no estimula sino que puede inhibir la diferenciación (Miranda y Godman, 1972; Hepler, 1972; Springer y Perdue, 1972).

Las observaciones realizadas por Donegani y Filógamu (1971), y las del presente trabajo, son coincidentes en definir un efecto antidiferenciador de la colchicina. Podemos afirmar que, en nuestras preparaciones, tal efecto no es debido a una acción degenerativa directa sobre las células gustativas. El bloqueo en el transporte axoplásmico y en la liberación de los factores tróficos, serían los factores responsables de la desdiferenciación observada. Estas alteraciones explicarían por sí mismas todo el proceso de desdiferenciación en el caso de que las células gustativas provengan de células epiteliales. Si estas células provienen de las células de Schwann, es posible que la colchicina haya producido efectos inhibitorios directos sobre este componente.

Hansson y Norström (1971), estudiaron la reacción glial inducida por el tratamiento con colchicina en el sistema hipotálamo-hipofisiario de la rata. De acuerdo con estos autores, la colchicina produce un aumento en el número de filamentos y microfilamentos de los astrocitos. Al mismo tiempo, observaron un aumento en el número de organoides citoplasmáticos, los cuales aparecían concentrados en la región perinuclear. En los procesos citoplas

máticos de estas células, las mitocondrias se acumulan en nidos que fueron denominados gliosomas.

Los oligodendrocitos reaccionan también a la inyección de colchicina con un aumento de su material filamentos y de la densidad de la matriz citoplasmática. Algunas células gliales especializadas, tales como los pituicitos, presentan alteraciones ultraestructurales similares. Tales cambios fueron interpretados como una evidencia de la interrupción del transporte citoplasmático en los mismos gliocitos. Este hecho sería responsable de la acumulación de organoides y filamentos en el citoplasma perinuclear, ya que estos elementos no pueden migrar hacia el extenso sistema de prolongaciones que estas células poseen. Alteraciones similares son producidas por la colchicina en células gliales de diversos sistemas (Angevine, 1957; Schochet y col., 1969; Norström y col., 1971).

Nuestras observaciones ultraestructurales son, en parte, comparables a lo descrito por Hansson y Norström, ya que también fue observado un aumento en el número de filamentos citoplasmáticos de las células de Schwann, lo que demuestra un efecto directo de la droga sobre estas células. Una alteración a nivel de las células de Schwann podría hacerlas más resistentes a los factores diferenciadores.

Cualquiera que sea el caso, el análisis comparativo de los experimentos con inyecciones únicas y dobles de col

chicina demuestran que las células oscuras presentes en el momento del tratamiento, continúan su diferenciación hacia elementos intermedios y claros. El aumento observado en el número de células claras con respecto a los otros tipos celulares, demuestra que en estos botones se desvía el equilibrio celular hacia los componentes de mayor edad y, por consiguiente, próximos a desaparecer. Al ser eliminadas por descamación las células claras, mecanismo éste que es sugerido por todas las observaciones realizadas en el presente trabajo, se produciría la desaparición de los botones gustativos. La colchicina tampoco parece haber afectado a la vida media de las células gustativas ya que han sido necesarios por lo menos 10 días para obtener la desaparición o la disminución del número de los botones gustativos.

La reversibilidad del efecto de la colchicina sobre el sistema papilar, está de acuerdo con la referida por los autores ya citados en sistema nervioso central y sistema nervioso periférico. Quizá la conclusión más importante que deriva de nuestros experimentos que acabamos de comentar, es que la diferenciación de las células gustativas parece presentar una sola fase neurodependiente, és-ta es, la fase de iniciación que lleva a la aparición de las células oscuras de los botones. El resto del proceso puede depender quizá de otros factores diferenciadores, pero no sería, aparentemente, sensible a un control neural.

Capítulo 7. CONCLUSIONES.

El estudio del origen, diferenciación y maduración de unas estructuras claramente neurodependientes, como son los botones gustativos de la papila circunvalada central de la rata, nos han llevado a las siguientes conclusiones:

1) Los botones gustativos de la papila circunvalada, no han aparecido todavía en el momento del nacimiento, pero se pueden ver ya esbozados en los animales del cuarto día de vida postnatal. Estos botones primitivos están for mados casi exclusivamente por una agrupación de células os curas y fusiformes, apenas diferentes de las que constituy en el epitelio gustativo intercorpuscular.

2) Antes de la aparición de los botones primitivos, las fibras del plexo papilar han perforado ya la lámina ba sal del epitelio y aparecen agrupadas en contacto con la membrana citoplasmática de las células epiteliales.

3) Las células epiteliales, así como las células que forman los botones primitivos de los animales de primera semana, responden negativamente a la reacción de ATPasa. Sin embargo, las células de Schwann del plexo papilar son ATPasa positivas.

4) Las células de los botones primitivos son ultra

estructuralmente idénticas a las del resto del epitelio gustativo.

Estos resultados nos han permitido determinar que:

- Los botones primitivos de la primera semana están constituídos por las células epiteliales que conformarán, más tarde, la cápsula de los botones definitivos. Se desarrolla antes la cápsula, que los propios botones.

5) Durante la primera y la segunda semana postnatal, se observó una penetración de fibras nerviosas y células de Schwann en el epitelio gustativo. Simultáneamente, los botones de estos animales comienzan a presentar una actividad ATPásica creciente. Los botones primitivos van siendo gradualmente "rellenados" por células gustativas. El resto del epitelio gustativo, incluyendo la cápsula de los botones, continúa siendo ATPasa negativo.

6) Durante la segunda semana se desarrollan los botones gustativos definitivos. Estos botones contienen tres tipos de células: oscuras, intermedias y claras. Se observaron formas de transición entre estos tipos celulares, lo que de por sí indica que:

- Las distintas células que forman los botones representan estadios evolutivos de un mismo tipo celular. Las células oscuras se diferenciarían a partir de las células de Schwann que han penetrado junto a las fibras nerviosas y han quedado envueltas por las células capsulares epiteliales ya mencionadas. Esta diferenciación estaría prece-

dida por una fase mitótica. Durante la segunda semana se produce una maduración masiva de las células oscuras, por lo que las células intermedias y las claras se hacen abundantes. El gran número de células oscuras que contienen estos botones, representa un elemento diferenciado de reserva para su futura maduración así como también un componente arquitectónico que contribuye al aislamiento y sostén de las fibras nerviosas intracorpúsculares. Las células oscuras desarrollan mesoaxones que envuelven a las fibras y terminaciones nerviosas exceptuando solamente las superficies sinápticas.

7) Los botones gustativos de la papila circunvalada central de los animales de tercera semana presentan un aumento en el número de sus células intermedias; las células oscuras siguen siendo las más numerosas y las células claras comienzan a mostrar signos de degeneración. El análisis ultraestructural y la curva obtenida de los recuentos de los diferentes tipos celulares en los botones de primera, segunda y tercera semana, indica que:

- Las células intermedias representan el estadio final del proceso de maduración de las células gustativas.

8) En los animales adultos, el sistema de diferenciación y maduración ha alcanzado un equilibrio distinto que en el animal de la tercera semana. El número total de las células del botón disminuye ligeramente. Las células oscuras siguen siendo las más abundantes, pero el número de

células intermedias ha disminuído considerablemente. Esta disminución en el número de células intermedias sugiere que

- El proceso de diferenciación y maduración de los botones gustativos del animal adulto está influenciado por ciertos mecanismos cuyo funcionamiento no ha comenzado aún en la tercera semana.

En resumen, la principal conclusión del estudio ontogénico de los botones gustativos son las siguientes:

a) los diversos tipos celulares que conforman los botones, son distintos estadios de una línea de diferenciación única.

b) las células oscuras representan la "entrada" al sistema. Estas células maduran a células intermedias, las cua les degeneran luego a células claras que, al salir del sistema, completan el ciclo.

c) las células gustativas son, probablemente, de naturaleza glial.

Estos hallazgos fueron complementados con los resultados obtenidos de la parte experimental de este trabajo.

9) La extirpación de la papila circunvalda es segui da de una regeneración completa de la misma. Las papilas neoformadas pueden ser típicas o atípicas y se desarrollan en tan solo 5 ó 6 días. Los botones gustativos aparecen más tardíamente. La reinervación del sistema es necesaria para que se formen los nuevos botones gustativos. Estos, aparecen en los lugares más inervados y en cantidades pro

porcionales al número de fibras neoformadas. La regeneración de los botones se realiza de una manera semejante a la diferenciación normal de estas estructuras durante las dos primeras semanas de vida postnatal y el tiempo necesario para que se realice esta rediferenciación es también similar.

10) El traslado de la papila, junto con su sistema de inervación, sus vasos sanguíneos y sus glándulas serosas a una zona de la superficie lingual muy próxima al sitio de implante original (autoinjertos pediculados), ha mostrado que: a) se mantiene el proceso de diferenciación en la papila injertada y b) se regenera una papila nueva en el sitio primitivo.

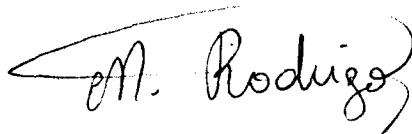
Se observó que los botones gustativos de la papila injertada disminuyen en número y tamaño; así mismo, el número de botones en la papila regenerada es menor que en los controles (animales puramente depapilados). Esta característica es debida, en parte, a que las fibras que inervan la papila original son compartidas ahora por la papila injertada y la papila regenerada y, en parte, a las alteraciones producidas a nivel de las glándulas serosas. Esto ha sido estudiado en detalle por Fernández (1977). Los experimentos de trasplante corroboran, por lo tanto, la realidad de un paralelismo entre la cantidad de fibras nerviosas y el número de botones gustativos. Demuestran, además, que el tamaño de los botones, vale decir el número de células que los constituyen, varía también paralelamente al volumen de su inervación.

11) Los experimentos realizados mediante inyecciones intrapapilares de colchicina, demostraron que esta droga es capaz de detener el proceso de diferenciación de los botones gustativos. Este efecto es debido a la interrupción del transporte axoplásmico de los factores tróficos neurales y no a las propiedades antimitóticas o a la citotoxicidad de la droga. Esta conclusión se apoya en las siguientes observaciones: a) La inyección de colchicina produjo una detención del transporte axoplásmico de AChE en el plexo y en el ganglio papilar, b) No provocaron efectos degenerativos sobre el sistema de inervación, incluyendo las fibras intraepiteliales, c) La desaparición de los botones después de la inyección, requirió un periodo de tiempo equivalente al de la vida media de sus células constitutivas.

En los animales inyectados con colchicina, las primeras células gustativas en desaparecer fueron las del tipo oscuro. Las células intermedias y las claras continuaron formándose a partir de las células oscuras presentes en el momento de la inyección. La colchicina inhibió, por lo tanto, la primera etapa del proceso diferenciador, es decir, la entrada de células oscuras al sistema. Este efecto no es debido a la capacidad antimitótica de la droga, ya que la colchicina bloquea la división celular durante solamente 24 horas. Por el contrario, el bloqueo colchicínico del transporte axoplásmico y de la liberación de productos secretorios, es prolongado. La interrupción del transporte axoplásmico y de la liberación de los factores

tróficos neurales a los botones gustativos, es el elemento responsable de la desaparición de la actividad diferenciadora a nivel de estos botones. Si como ya hemos visto, el bloqueo colchicínico afecta exclusivamente a la diferenciación de las células oscuras, podemos arri^{var} a lo que es quizá la conclusión más importante de este trabajo:

-Los factores neurotróficos actuarían como "inductores", provocando una activación de ciertos genes reprimidos en una célula específica, la cual se diferencia, entonces, en una célula gustativa del tipo oscuro. La posterior maduración de estas células (células intermedias), su posterior degeneración (células claras) y, finalmente, su salida del sistema, no son procesos comandados directamente por una influencia neural.

M. Rodríguez

Capítulo 8. BIBLIOGRAFIA.

- 1.- ALBUQUERQUE, E.X., WARNICK, J.E., TASSE, J.R., SANSO
NE, F.M.: Effects of vinblastine and colchicine
on neural regulation of the fast and slow skeletal
muscles of the rat: An electrical and ultrastruc-
tural study. *Expl. Neurol.*, 37, 607-643, 1972.
- 2.- ANGEVINE, J.B.: Nerve destruction by colchicine in
mice and golden hamsters. *J. exp. Zool.*, 136, 363-
391, 1957.
- 3.- BANKS, P., MANGNALL, D., MAYOR, D.: The re-distribution
of cytochrome oxidase, noradrenaline and adenosine
triphosphate in adrenergic nerves constricted at
two points. *J. Physiol. (Lond.)* 200, 745-762, 1969.
- 4.- BANKS, P., MAYOR, D., TOMLINSON, D.R.: Further evidene
ce for the involvement of noradrenaline storage
granules. *J. Physiol. (Lond.)* 219, 755-761, 1971.
- 5.- BARADI, A.F.: Intragemal spaces in taste buds. *Zeitsch*
rift für Zellforschung, 65, 313-318, 1965.
- 6.- BARADI, A.F., BOURNE, G.H.: Theory of tastes and odors.
Science, 113, 660-661, 1951.
- 7.- BARADI, A.F., BOURNE, G.H.: Gustatory and olfactory
epithelia. *Int. Rev. Cytol.* 2, 289-330, 1953.
- 8.- BARADI, A.F., BOURNE, G.H.: Histochemical localization
of cholinesterase in gustatory and olfactory epi-
thelia. *J. Histochem. Cytochem.*, 7, 2-7, 1959.
- 9.- BARADI, A.F., BRANDES, D.: Electron microscopic local
ization of alkaline phosphatase in papilla foliaa
ta. *J. Histochem. Cytochem.*, 11, 263-272, 1965.

- 10.- BEIDLER, L.M.: Dynamics of taste cells. In olfaction and taste (Ed. Y. Zotterman), 133-145. New York: Pergamon Press, 1963.
- 11.- BEIDLER, L.M.: Innervation of rat fungiform papilla. In: Olfaction and taste. 3, 352-369. Pfaffman ed. New York: Rockefeller Univ. Press., 1969.
- 12.- BEIDLER, L.M.: Physiological properties of mammalian taste receptors. In: Taste and smell invertebrates. 51-67, Wolstenholme and Knight, eds. Ciba Found. Symp. London: J. y A. Churchill, 1970.
- 13.- BEIDLER, L.M., SMALLMAN, R.L.: Renewal of cells within taste buds. J. Cell Biol., 27, 263-272, 1965.
- 14.- BLOOM, W., Fawcett, D.W.: A textbook of Histology 8th edit., 67-69. Philadelphia: W.B. Saunders Co., 1962.
- 15.- BORISY, G.G., TAYLOR, E.W.: The mechanism of action of colchicine: Colchicine binding to sea urchin eggs and the mitotic apparatus. J. of Cell Biology. 34, 535-548, 1967.
- 16.- BOUDIER, J.A., DETIEUX, Y., DUTILLET, P., CAU, P.: Effects d'injections intracisternales de colchicine sur la neurohypophyse de rat rehydrate après privation d'eau. Comptes Rendus des Séances de la Société de Biologie et de ses Filiales, 165, 1089-1092, 1971.
- 17.- BOURNE, G.H.: Alkaline phosphatase in taste buds and nasal mucosa. Natura (Lond.), 161, 445-446, 1948.
- 18.- BRADLEY, R.M., STERN, I.B.: The development of the human taste bud during the foetal period. J. Anat.

101, 4, 743-752, 1967.

- 19.- BROCKELBANK, M.C.: Degeneration and regeneration of lateral line organs in Ameiurus nebulosus. Journal of Experimental Zoology. 42, 293-305, 1925.
- 20.- DAHLSTROM, A.: The transport of noradrenaline between two simultaneously performed ligations of the sciatic nerves in the rat and cat. Acta Physiol. Scand. 69, 158-166, 1967:
- 21.- DE ROBERTIS, E., GERSCHENDFELD, H.M.: Submicroscopic morphology and function of glial cells. Intern. Rev. Neurobiol., 3 C.C. Pfeiffer and J.R. Smythies (Eds.). New York-London, Academic Press (pp. 1-61) 1961.
- 22.- DESGRANGES, J.C.: Sur la double innervation des cellules sensorielles des bourgeons du gout des barbillons du poisson-chat. C.r. Acad. Sci. (Paris) 263, 1103-1106, 1966.
- 23.- DONEGANI, G., FILOGAMO, G.: Sul comportamento dei recettori nelle papillae foliate dopo trattamento con colchicine del nervo glossofaringeo, nel coniglio. Boll. Soc. Biol. Sper. 47, 156-159, 1971.
- 24.- DRENCKHAHN, D.: Untersuchungen an Regio olfactoria und Nervus olfactorius der Silbermöwe (Larus argentatus). Z. Zellforsch. 106, 119-142, 1970.
- 25.- DUNCAN, C.J.: Excitatory mechanisms in chemoreceptors. J. theor. Biol. 5, 114-126, 1963a.
- 26.- DUNCAN, C.J.: Synaptic transmission at taste buds. Nature (Lond.) 203, 875-876, 1963b.

- 27.- DUNCAN, C.J.: The transducer mechanism of sense organs. *Naturwissenschaften*, 7, 172-173, 1964:
- 28.- von DURING, M., ANDRES, K.H.: The ultrastructure of Taste and Touch Receptors of the Frog's Taste Organ. *Cell Tiss. Res.* 165, 185-198, 1976.
- 29.- ELLIS, R.A.: Cholinesterase in the mammalian tongue. *J. Histochem. Cytochem.*, 7, 156-163, 1959.
- 30.- ENGSTROM, H., RYTZNER, C.: The fine structure of taste buds and taste fibers. *Ann. oto-rhino-laryng.* 65, 361-375, 1956.
- 31.- FAHRMANN, W.: Licht und elektronenmikroskopische Untersuchungen an der Geschmacksknospe des neotenen Axolotls (*Siredon mexicanum* SHAW). *Z. Zellforsch.* 77, 117-152, 1967.
- 32.- FAHRMANN, W., SCHUCHARDT, E.: Licht und elektronenmikroskopische Befunde an der Geschmacksknospen der Axolotlzunge. *Experientia* (Basel) 23, 657-659, 1967.
- 33.- FARBMAN, A.I.: Electron microscope study of the developing taste bud in rat fungiform papila. *Develop. Biol.* 11, 110-135, 1965a.
- 34.- FARBMAN, A.I.: Fine structure of the taste bud. *J. Ultrastruc. Res.* 12, 328-350, 1965b.
- 35.- FARBMAN, A.I.: Fine structure of degenerating taste buds after denervation. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 22, 55-68, 1969.
- 36.- FARBMAN, A.I.: Differentiation of taste buds in organ culture. *The Journal of Cell Biology*. Vol. 52,

489-493, 1972.

- 37.- FARBMAN, A.I., JONKERS, J.D.: Fine structure of the Taste Bud in the Mud Puppy, Necturus maculosus. Am. J. Anat., 131, 353-370, 1971.
- 38.- FERNANDEZ, H.L.: Neurotrophic effects in relation to axoplasmic transport. Act. Physiol. Lat.-Am., 23, 6, 189-191, 1973.
- 39.- FERNANDEZ, H.L., HUNEEUS, F.C., DAVIDSON, P.F.: Studies on the mechanism of axoplasmic transport in the crayfish cord. J. Neurobiol., 1, 395-409, 1970.
- 40.- FUJIMOTO, S.: Fine structure and functions of the taste bud cells. J. Jap. Med. Assoc. 69, 1421, 1973.
- 41.- GABELLA, G.: Taste buds and adrenergic fibers. J. Neurol. Sci., 9, 237-242, 1969.
- 42.- GEREN, B.B., SCHMITT, F.O.: Electron microscope studies of the Schwann cells and its constituents with particular reference to the axon. Symp. on Fine Structure of Cells. 8th Congress of Cell Biology, Leiden, 1954. Interscience Publ., Inc., New York. pp. 251-260, 1955.
- 43.- GICQUAUD, C.R., COUILLARD, P.: Etude de l'action de la colchicine et de la vinblastine sur les ATPases d'amoebe proteins. Rev. Can. Biol. 31, 97-103, 1972.
- 44.- GRABERG, J.: Beitrage zur Genese des Geschmacksorgans des Menschen. Morph. Arbeiten. 8, 117-131, 1898.
- 45.- GRABERG, J.: Zur kenntiniss des cellularem Baues der Geschmacksknospen beim . Menschen. Anat. Hefte.

12, 337-368, 1899.

- 46.- GRAY, E.G., GUILLERY, R.W.: An electron microscope study of the ventral nerve cord of the leech. *Z. Zellforsch.* 60, 826-849, 1963.
- 47.- GRAY, E.G., WATKINS, K.C.: Electron microscopy of taste buds of the rat. *Z. Zellforsch.* 66, 583-595, 1965.
- 48.- GRAZIADEI, P.P.C.: The ultrastructure of vertebrate taste buds. In: (ed. by) C. Pfaffmann: *Olfaction and Taste III*. New York, Rockefeller University, 315-330, 1969.
- 49.- GRAZIADEI, P.P.C.: The ultrastructure of taste buds in mammals. In: *Second Symposium on Oral Sensation and Perception*. J.F. Bosma, ed. Charles C Thomas, Springfield, Illinois, 5-62, 1970.
- 50.- GRAZIADEI, P.P.C., DE HAN, R.S.: The ultrastructure of the frog's taste organs. *Acta anat. (Basel)* 80, 563-603, 1971.
- 51.- GRIFFINI, L.: Sulla riproduzione degli organi gustatorii. *Rc. Ist. Lomb. Sci. Lett.* 20:667, 1887.
- 52.- GROVER-JOHNSON, N., FARBMAN, A.I.: Fine structure of taste buds in the barbel of the cat fish, *Ictalurus punctatus*. *Cell Tiss. Res.* 169, 395-403, 1976.
- 53.- GUSTAVSSON, M.: Effect of colchicine on DNA synthesis in plerocerooids of *Diphyllibothrium dendriticum* (Cestoda). *Experimental Cell Research.* 50, 1-8, 1968.
- 54.- GUTH, L.: The effects of glossopharyngeal nerve tran

- section on the circumvallate papilla of the rat. Anat. Rec. 128, 715-731, 1957.
- 55.- GUTH, L.: Taste buds on the cat's circumvallate papilla after reinnervation by glossopharyngeal, vagus and hypoglossal nerves. Anat. Rec. 130, 25-37, 1958.
- 56.- GUTH, L.: Histological changes following partial denervation of the circumvallate papilla of the rat. Experimental Neurology 8, 336-349, 1963.
- 57.- GUTH, L.: Trophic influences of nerve on muscle. Physiol. Rev. 48, 645-687, 1968.
- 58.- GUTH, L.: Trophic effects of vertebrates neurons. Neurosci. Res. Prog. Bull. 7, 1-73, 1969.
- 59.- GUTMANN, E.: Neurotrophic relations in the regeneration process. In: Mechanisms of Neural Regeneration. (Progress in Brain Research, Vol.13). Singer, M. and Schädé, J.P., eds. Amsterdam: Elsevier, 72-112, 1964.
- 60.- de HAN, R.S., GRAZIADEI, P.P.C.: The innervation of frog's taste organs. A histochemical study. Life Sci. 13, 1435-1449, 1973.
- 61.- HANSSON, H.A., NORSTROM, A.: Glial relations induced by colchicine-treatment of the hypothalamic-neurohypophyseal System. Z. Zellforsch. 113, 294-310, 1971.
- 62.- HEIDENHAIN, M.: Über die Sinnesfelder und die Geschmacksknospen der Papilla foliata des Kaninchens. Arch. mikr. Anat. 85, 365-479, 1914.

- 63.- HELLMAN, T.J.: Die Genese der Zungen papillen beim Menschen. Uppsala LäkFör. Förh 26-27, 1-69, 1922.
- 64.- HEPLER, P.: Differential inhibition of cell division in microspores of marsilea with colchicine and iso propyl-M-Phenylcarbamate. J. of Cell Biology, p112, 1972.
- 65.- HERMANN, F.: Beitrag zur Entwicklungsgeschichte des Geschmacksorgangs beim Kaninchen. Arch. mikr. Anat. 24, 216-229, 1885.
- 66.- HERMANN, F.: Studies über den feineren Bau des Geschmacksorgans, Sitzung der math-phys. Akad. Wissensch. Munchen, 18:277, 1889.
- 67.- HIRATA, V.: Fine structure of terminal buds on the barbels of some fishes. Arch. Histol. Jap. 26, 507-523, 1966.
- 68.- HIRATA, K., Nada, O.: A monoamine in the gustatory cell of the frog's taste organ. A fluorescence histochemical and electron microscopic study. Cell Tiss. Res. 159, 101-108, 1975.
- 69.- HODOSH, M., MONTAGNA, W.: Cholinesterases in the tongue of Potto. Anat. Rec. 146, 7-15, 1963.
- 70.- HOFFMAN, A.: Über die Verbreitung der Geschmacksknospen beim Menschen. Virchow's Arch. path. Anat. Physiol. 62, 516-530, 1874.
- 71.- IWAYAMA, T.: Changes in cell population of taste buds during degeneration and regeneration of their sensory innervation. Anatomical Record. 138, 283-297, 1970.

- 72.- IWAYAMA, T., NADA, O.: Histochemical observations on the phosphatases of the tongue, with special reference to taste buds. *Arcivum histologicum japonicum* (Okayama) 28, 151-163, 1967.
- 73.- IWAYAMA, T., NADA, O.: Histochemical observation on phosphatase activities of degenerating and regenerating taste buds. *Anat. Rec.* 163, 31-38, 1969.
- 74.- JAHNKE, K.: Der feinstrukturelle Nachweis der Acetylcholinesterase-Aktivität in den Geschmacksknospen der Papillae foliate des Kaninchens. *Arch. Klin. exp. Ohr., Nas. u. Kehlkopf-Heilk.* 203, 125-152, 1972.
- 75.- KAPELLER, K., MAYOR, D.: The accumulation of noradrenaline in constricted sympathetic nerves as studied by fluorescence and electron microscopy. *Proc. Roy. Soc.* 167, 282-292, 1967.
- 76.- KARNOWSKY, M.J.: A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 27, 137A, 1965.
- 77.- KEEN, P., LIVINGSTON, A.: Decline of tissue noradrenalin under the influence of a mitotic inhibitor. *Nature* 227, 967-968, 1970.
- 78.- KIMURA, K.: Factors affecting the response of taste receptors of rat. *Kumamoto Med. J.* 14, 95-99, 1961.
- 79.- KOLMER, W.: Über Strukturen im Epithel der Sinnesorgane. *Anat. Anz.* 36, 281-299, 1910.
- 80.- KREUTZBERG, G.W., SCHUBERT, P., TOTH, L., RIESKE, E.: Intradendritic transport to postsynaptic sites.

Brain Res. 62, 399-404, 1973.

- 81.- KREUTZBERG, G.W., TOTH, L.: Dendritic secretion: a way for the neuron to communicate with the vasculature. Naturwissenschaften 1:37, 1974.
- 82.- KRISHAN, A.: Fine Structure of Cytochalasine-induced multinucleated cells. J. Ultrast. Res. 36, 191-204, 1971.
- 83.- KRISHAN, A., HSU, D.: Binding of colchicine -³H to vinblastine and vincristine induced crystals in mammalian tissue culture cells. J. Cell Biol. 48, 407-410, 1971.
- 84.- KRISHAN, A., WHITLOCK, S.: Cytochalasin B and cell division: a study with time-lapse cinematography. J. of Cell Biology pl42, 1972.
- 85.- LACY, P.E., HOWELL, S.L., YOUNG, D.A., FINK, C.I.: New hypothesis of insulin secretion. Nature (Lond.) 219, 1177-1179, 1968.
- 86.- LANDGREEN, S., LILJESTRAND, G., ZOTTERMAN, Y.: Chemical transmission in taste endings. Acta Physiol. Scand., 30, 105-114, 1954.
- 87.- LANE, N.J.: Intranuclear fibrillar bodies in actinomycin D-treated oocytes. J. Cell Biol. 40, 286-291, 1969.
- 88.- LANG, K., SIEBERT, G., ESTELMANN, T.: Hemmung des adenosintriphosphatase durch colchicin. Experientia (Basel) 7, 379-380, 1951.
- 89.- von LENHOSSEK, M.: Der feinere Bau und die Nervenendigungen der Geschmacksknospen. Anat. Anz. 8:121

1893.

- 90.- LENTZ, T.L.: Nerve trophic function: in vitro assay of effects of nerve tissue on muscle cholinesterase activity. Science, (N.Y.) 171, 187-189, 1971.
- 91.- LENTZ, T.L.: A role of cyclic AMP in a neurotrophic process. Nature (Lond) 238, 154-155, 1972.
- 92.- de LORENZO, A.J.: Electron microscopic observations on the taste buds of the rabbit. J. Biophysic. and Biochem. Cytol. 4, 143-163, 1958.
- 93.- de LORENZO, A.J.: Studies on the ultrastructure and histophysiology of cell membranes, nerve fibers and synaptic junctions in chemoreceptors. In: Olfaction and taste (Y. Zottermand, ed.) p5-17. London: Pergamon Press, 1963.
- 94.- LOVEN, C.: Bidrag till Kännedomen om tungans smakpiller. Med. Arch. (Stockholm) 3, 1-14, 1867.
- 95.- LUCHTEL, D., BLOEMINK, J.G., LEAL, S.W.: The effect of injected cytochalasin B in filament organization in the cleaving egg of Xenopus laevis. J. Ultrastructure Research, 54, 406-419, 1976.
- 96.- LUCO, J.V., EYZAGUIRRE, C.: Fibrillation and hypersensitivity to ACh in denervated muscle: effect of length of degenerating nerve fibres. Journal of Neurophysiology 18, 65-73, 1955.
- 97.- LUFT, J.H.: Improvements in epoxy embedding methods. J. biophys. biochem. Cytol. 2, 409-414, 1961.
- 98.- LUSTIG, A.: Beitrage zur Kenntniss der Entwicklung der Geschmacksnospen. Sber. Akad. Wiss. Wien 89

308-324, 1884.

- 99.- MALAWISTA, S.E., SATO, H., BENSCH, K.G.: Vinblastine and griseofulvin reversible disrupt the living mitotic spindle. *Science*, 160:770, 1968.
- 100.- MARCHAND, M.L.: Development des papilles gustatives chez le foetus. *C.r. Sèanc, Soc. Biol.* 54:910, 1902.
- 101.-MATTERN, C.F.T., PARAN, N.: Evidence of a contractile mechanism in the taste bud of the mouse fungiform papilla. *Exp. Neurol.* 44, 461-469, 1974.
- 102.- MAY, R.M.: The relation of nerves to degenerating and regenerating taste buds. *J. exp. Zool.* 42, 371-410, 1925.
- 103.- MEYER, S.: Durchschneidungsversuche am Nervus glossopharyngeus. *Archiv für mikroskopische Anatomie und Entwicklungsmechanik* 48, 143-145, 1897.
- 104.- MIRANDA, A., GODMAN, G.: Contractility and structure of differentiating myotubules treated with cytochalasin D (CD). *J. of Cell Biology.* p178, 1972.
- 105.- MURRAY, R.G.: Cell types in rabbit taste buds. In: *Olfaction and taste III*, p331-344, Pfaffman, ed. New York: Rockefeller Univ. Press., 1969.
- 106.- MURRAY, R.G.: Ultrastructure of taste receptors. In: *Handbook of sensory physiology*, vol. IV Chemical senses, part. 2. Taste, p31-50, Beidler, ed. Berlin-Heidelberg-New York: Springer, 1971.
- 107.- MURRAY, R.G.: The structure of taste buds. In: *Ultrastructure of sensory organs*, vol.1, p1-81,

Friedman, ed. Amsterdam: North Holland, 1973.

- 108.- MURRAY, R.G., MURRAY, A.: The fine structure of the taste buds of rhesus and cynomolgus monkeys. Anat. Rec. 138, 211-233, 1960.
- 109.- MURRAY, R.G., MURRAY, A.: Fine structure of taste buds of rabbit foliate papillae. J. Ultrastruct. Res. 19, 327-353, 1967.
- 110.- MURRAY, R.G., MURRAY, A., FUJIMOTO, S.: Fine structure of gustatory cells in rabbit taste buds. J. Ultrastruct. Res. 27, 444-461, 1969.
- 111.- MURRAY, R.G., FUJIMOTO, S.: Demonstration of cholinesterase in rabbit foliate taste buds. Proc. Septième Congress International de Microscopie Electronique, Grenoble, France. p757-758, 1970.
- 112.- MURRAY, R.G., MURRAY, A.: The anatomy and ultrastructure of taste endings. In: Taste and smell in vertebrates. p3-30, Wolstenholme and Knight, eds. Ciba Found. Symp. London. J. and A. Churchill, 1970.
- 113.- MURRAY, R.G., MURRAY, A.: Relations and possible significance of taste bud cells. In: Contribution to sensory physiology. vol. 5, p47-95, Neff. ed. New York: Academic Press, Inc., 1971.
- 114.- MURRAY, R.G., MURRAY, A., HELLEKANT, G.: Fine structure of taste buds of rat fungiform papillae. In: Proceedings of the Fourth International Symposium on Olfaction and Taste. Schneider, ed. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft MBH, 1972.
- 115.- NACHMANSOHN, D.: Proteins in excitable membranes.

Science, 168, 1059-1066, 1970.

- 116.- NACHMANSOHN, D.: Chemical events in conducting and synaptic membranes during electrical activity. Proc. Nat. Acad. Sci. (U.S.A.), 68, 3170-3174, 1971.
- 117.- NEMEISCHKE-GANSLER, H., FERNER, H.: Über die Ultrastruktur der Geschmacksknospen. Z. Zellforsch. 63, 155-178, 1964.
- 118.- NEUMANN, E., NACHMANSOHN, D., KATCHALSKY, A.: An attempt at integral interpretation of nerve excitability. Proc. Nat. Acad. Sci. (U.S.A.), 70, 727-731, 1973.
- 119.- NORSTROM, A., HANSSON, H.A., SJOSTRAND, J.: Effects of colchicine on axonal transport and ultrastructure of the hypothalamo neurohypophysial system of the rat. Z. Zellforsch, 113, 271-293, 1971.
- 120.- OAKLEY, B.: Altered temperature and taste responses from cross-regenerated sensory nerves in the rats tongue. J. Physiol. 188, 353-371, 1967.
- 121.- OLIVIERI-SANGIACOMO, C.: Ultrastructural modifications of denervated Taste Buds. Z. Zellforsch. 108, 397-414, 1970.
- 122.- OLMSTED, J.M.D.: The results of cutting the seventh cranial nerve in Ameiurus nebulosus (Lesueur). J. exp. Zool. 31, 369-401, 1920.
- 123.- OLMSTED, J.M.D.: Effects of cutting the lingual nerve of the dog. J. comp. Neurol. 33, 149-154, 1921.
- 124.- OZEKI, M. Noma, A.: The actions of tetrodotoxin, pro-

caine and acetylcholine on gustatory receptions in frog and rat. Jap. J. Physiol. 22, 467-475, 1972.

- 125.-PALMER, C.G., LIVENGGOOD, D., WARREN, A.K., SIMPSON, P.J., JHONSON, I.S.: The action of vincal^eukoblastine on mitosis in vitro. Exp. Cell Res. 20:198, 1960.
- 126.- PARAN, N., MATTERN, C.F.T.: The distribution of acetylcholinesterase in buds of the rat vallate papilla as determinated by electron microscope histochemistry. J. comp. Neurol. 159, 29-44, 1975.
- 127.- PARAN, N., MATTERN, C.F.T., HENKIN, R.I.: Ultrastructure of the Taste Bud of the Human Fungiform Papilla. Cell Tiss Res. 161, 1-10, 1975.
- 128.-PARKER, G.H.: On the trophic impulse so-called, its rate and nature. Amer. Naturalist 66, 147-158, 1932
- 129.- PARKER, G.H., PAINE, V.L.: Progressive degeneration of the lateral-line nerve in the catfish. Proc. Nat. Acad. Sci., vol. 17, p589-591, 1931.
- 130.- PERISIC, M., CUENOD, M.: Synaptic transmission depressed by colchicine blockage of axoplasmic transport Science, 175, 1140-1142, 1972.
- 131.-POISNER, A.M., BERNSTEIN, J.: A possible role of microtubules in catecholamine release from the adrenal medulla: effect of colchicine, vinca alkaloids and deuterium oxide. J. Pharmac. exp. Ther. 177, 102-108, 1971.
- 132.- RAJBANSHI, B.K., TEWARI, H.B.: Structure of the tas-

- te bud of Saccobranchus fossilis. Z. Biol. 116, 22-28, 1968.
- 133.- RAKHAWY, M.T.E.: The histochemistry of the lymphatic tissue of the human tongue and its probable function in taste. Acta. anat. 51, 259-270, 1962.
- 134.- RANVIER, L.A.: Traité Technique d'Histologie. Paris, Savy (Footnote, p948-949), 1875. Quoted from Zelená, 1964.
- 135.- RANVIER, L.A.: Traité Technique d'Histologie, 2nd edit., p742. Paris: Librairie Savy, 1889.
- 136.- RETZIUS, G.: Zur Kenntnis der Geschmacksorgane beim Kaninchen. Biol. Unters., N.F., 17, 72-81, 1912.
- 137.- REUTTER, K.: Die Geschmacksknospen der Zwergwelses Ameiurus nebulosus (Leseur). Morphologische und histochemische Untersuchungen. Z. Zellforsch. 120, 280-308, 1971.
- 138.-RHODIN, J.: An Atlas of Ultrastructure. Philadelphia, W.B. Saunders Co., 1963.
- 139.- RODRIGUEZ-ECHANDIA, E.L., RAMIREZ, B.U., FERNANDEZ, H.L.: Studies on the mechanism of inhibition of axoplasmic transport of neuronal organelles. J. Neurocytol. 2, 149-156, 1973a.
- 140.- RODRIGUEZ-ECHANDIA, E.L., DONOSO, A.O., BAZZAN, A.: Changes in plasma luteinizing hormone and prolactin after injection of vinblastine into the median eminence of the rat. J. Endocr. 60, 373-374, 1974.
- 141.- RODRIGUEZ-ECHANDIA, E.L., CAVICCHIA, J.C., RODRIGUEZ,

E.M.: Hormonal content and ultrastructure of the hypothalamo-neurohypophysial system of the rat after injection of vinblastine into the median eminence. J. Endocr., in press.

142.- SAKAI, K.: Studies on chemical transmission in taste fiber endings. II. The effect of cholinesterase inhibitor on the taste. Chem. Pharm. Bull., 13, 304-307, 1965.

143.- SAKAI, K., OZAWA, H.: Studies on chemical transmission in taste fiber endings. III. The action of acetylcholine and 2-dimethylaminoethanol on the taste fiber endings. Chem. Pharm. Bull. 13, 1440-1444, 1965.

144.- SANDMEYER, W.: Über das Verhalten der Geschmacksnerven nach Durchschneidung des Nervus glossopharyngeus. Arch. Anat. Physiol. Abt: J.y, 269-276, 1895.

145.- SCALZI, H.A.: The cytoarchitecture of gustatory receptors from the rabbit foliate papillae. Z. Zellforsch. 80, 413-435, 1967.

146.- SCHADE, J.P., FORD, D.H.: Basic Neurology. Elsevier scientific publishing company. Amsterdam-London-New York. pp131-138, 1973.

147.- SCHMIDT, W.: Licht-und elektronenmikroskopische Untersuchungen über die intrazelluläre Verarbeitung von Vitalfarbstoffen. Z. Zellforsch. 58, 573-637, 1962.

148.- SCHMITT, F.O.: Axon-satellite cells relationships in peripheral nerve fibers. Exp. Cell Res., Suppl.,

5, 33-57, 1958.

- 149.- SCHOCHET, S.S., Jr., LAMPERT, P.W., EARLE, K.M.: Oligodendroglial changes induced by intrathecal vincristine sulfate. Exp. Neurol. 23, 113-119, 1969.
- 150.- SCHULTE, E., HOLL, A.: Untersuchungen an den Geschmacksknospen der Barteln von Corydoras paleatus Jenyns. I. Feinstruktur der Geschmacksknospen. Z. Zellforsch. 120, 450-462, 1971.
- 151.- SCHULTE, E., HOLL, A.: Feinbau der Kopftentakel und ihrer Sinnesorgane bei Blennius tentacularis (Pisces Blenniiformes). Mar. Biol. 12, 67-80, 1972.
- 152.- SCHULZE, F.E.: Über die becherförmigen Organe der Fische. Z. wiss. Zool. 12, 218-222, 1863.
- 153.- SCHWALBE, G.: Das Epithel der Papillae vallatae. Arch. mikrosk. Anat. Entw. Mech. 3, 504-508, 1867.
- 154.- SINGER, M.: The trophic quality of the neuron: some theoretical considerations. In: Progress in brain res., vol. 13. Mechanisms of neural regeneration (eds. M. Singer and J.P. Schädé), p228-232. Amsterdam-London-New York: Elsevier Publishing Company, 1964.
- 155.- SINGER, M., SCHADE, J.P. (Eds): Mechanisms of neural regeneration. Progr. Brain Res. 13. Amsterdam-New York, Elsevier, 1964
- 156.- SINGER, M., SCHADE, J.P. (Eds): Degeneration patterns in the nervous system. Progr. Brain Res. 14. Amsterdam-London-New York, Elsevier, 1965.
- 157.- SJOSTRAND, J., FRIZELL, M., HASSELGREN, P.O.: Effects

of colchicine on axonal transport in peripheral nerves. *J. Neurochem.* 17, 1563-1570, 1970.

- 158.- SKOUBY, A.P., ZILSTORFF-PEDERSEN, K.: The influence of acetylcholine, menthol and strychnine on taste receptors in man. *Acta Physiol. Scand.* 34, 250-256, 1955.
- 159.- SPRINGER, A., PERDUE, J.: Cytological analysis of cytochalasin on cultured chick embryo fibroblast. *J. of Cell Biology.* p247, 1972.
- 160.- STAHR, H.: Über gewebliche Umwandlungen an der Zunge des Menschen im Bereiche der Papilla foliata. *Arch. mikrosk. Anat. EntwMech.* 75, 375-413, 1910.
- 161.- STATE, F.A., BOWDEN, R.E.M.: Innervation and cholinesterase activity of the developing taste buds in the circumvallate papilla of the mouse. *J. Anat.* 118, 2, 211-221, 1974.
- 162.- STORCH, V.N., WESCH, U.N.: Electron microscopic observations on the taste buds of some bony fishes. *Arch. histol. jap.* 32, 145-153, 1970.
- 163.- TAKEDA, M., HOSHINO, T.: Fine structure of taste buds in the rat. *Arch. Histol. Jap.* 37, 395-413, 1975.
- 164.- TATEDA, H.: The taste response of the isolated barbel of the catfish. *Comp. Biochem. Physiol.* 11, 367-378, 1964.
- 165.- TORREY, T.W.: The relation of taste buds to their nerve fibers. *J. Comp. Neurol.* 59:203, 1934.
- 166.- TORREY, T.W.: The influence of nerve fibers upon taste buds during embryonic development. *Proc. Nat.*

Acad. Sci. U.S.A., 26:627, 1940.

- 167.- TRUJILLO-CENOZ, O.: Electron microscope study of the rabbit gustatory bud. *Z. Zellforsch.* 46, 272-280, 1957.
- 168.- TUCKERMAN, G.: On the development of the taste organs of man. *J. Anat. Physiol.*, London. 23, 559-582, 1889.
- 169.- UGA, S.: The fine structure of gustatory receptors and their synapses in frog's tongue, *Symposia Cell Chem.* 16, 75-86, 1966.
- 170.- UGA, S.: A study on the cytoarchitecture of taste buds of rat circumvallate papillae. *Arch. Histol. Jap.* 31, 59-72, 1969.
- 171.- UGA, S., HAMA, K.: Electron microscopic studies on the synaptic region of the taste organ of carp and frogs. *J. Electron Micros.* 16, 269-276, 1967.
- 172.- VASTARINI-CRESI, G.: Chiasma gustativo (periferico) nella lingua dell uomo e di alcuni mammiferi. *Intern. Monatschr. Anat. Physiol. Bd.* 31, 1915.
- 173.- VENABLE, J., COGGESHALL, R.: The use of a simple lead citrate stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 25, 407A, 1965.
- 174.- VIJ, S., KANAGASUNTHERAM, R., KRISHNAMURTI, A.: Enzymatic changes in taste buds of monkey following transection of glossopharyngeal nerve. *Journal of Anatomy* 113, 425-432, 1972.
- 175.- von VINTSCHGAU, M.: Beobachtungen über die Veränderungen der Schmeckbecher nach Durchschneidung des

- N. glossopharyngeus. Pflügers Arch. ges. Physiol. 23, 1-13, 1880.
- 176.- von VINTSCHGAU, M., HONIGSCHMIED, J.: Nervus Glosso
pharyngeus und Schmeckbecher. Arch. Gesamte. Phy-
siol. Menschentiere. 14:443, 1877.
- 177.-WAGNER, C.E.: Dedifferentiation of taste bud cell fo
llowing transection of their nerve supply. Anato-
mical Record 115, 422(Abstract), 1953.
- 178.- WANG, E.: The effects of cytochalasin B on endocy-
tosis in BHK-21 cells. J. of Cell Biology p237.
1972.
- 179.- WELSCH, U., STORCH, V.: Die Feinstruktur der Gesch-
macksknospen von Welsen (*Clarias batrachus*) (L)
und Kryptopterus bicirrhys (Cuvier et Valenciennes)
Z. Zellforsch., 100, 552-559, 1969.
- 180.- WHITEAR, M.: Cell specialization and sensory func-
tion in fish epidermis. J. Zool. (Lond.) 163,
237-264, 1971.
- 181.- WHITEAR, M.: Apical secretion from Taste Bud and
other epithelial cells in Amphibians. Cell Tiss.
Res. 172, 389-404, 1976.
- 182.- WHITESIDE, B.: The regeneration of the gustatory appa-
ratus in the rat. J. comp. Neurol. 40, 33-45, 1926.
- 183.- WHITESIDE, B.: Nerve overlapping in the gustatory
apparatus of the rat. Journal of Comparative Neu-
rology. 44, 363-377, 1927.
- 184.- WISNIEWSKI, H., SHELANSKI, M.L., TERRY, R.D.: Effect
of mitotic spindle inhibitors on neurotubules and

- neurofilaments in anterior horn cells. J. Cell Biol. 38, 224-250, 1968.
- 185.- ZALEWSKI, A.A.: Changes in phosphatase enzymes following denervation of the vallate papilla of the rat. Exp. Neurol. 22, 40-51, 1968.
- 186.- ZALEWSKI, A.A.: Combined effects of testosterone and motor, sensory or gustatory nerve reinnervation on the regeneration of taste buds. Exp. Neurol. 24:285, 1969.
- 187.- ZALEWSKI, A.A.: Continuous trophic influence of chromatolysed gustatory neurons on taste buds. Anat. Rec. 167:165, 1970.
- 188.- ZANDER, R.: Über das Verbreitungsgebiet Gefühls-Geschmacksnerven in der Zungenschleimhaut. Anat. Anz., Bd. 14, 1897
- 189.- ZELENA, J.: Development, degeneration and regeneration of receptor organs. In: Progress in Brain Research, in: Mechanism of neural maturation (M. Singer and J.P. Schadé, eds.), vol. 13, 175-213. Amsterdam: Elsevier, 1964.
-

ADDENDUM

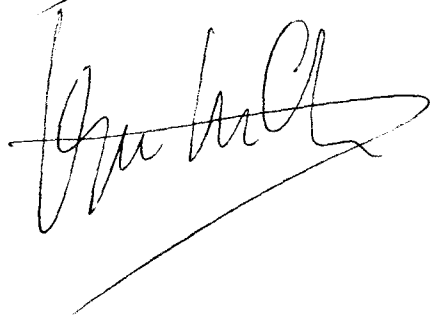
- CUTTS, J.H.: The effect of Vincalukoblastine on Dividing Cells in vivo. Cancer Res. 21, 168-172, 1961.
- EL BADAWI, A.; SCHENK, E.: Modification of Karnowsky roots. Histochem. Cytochem. 15, 580-585, 1967.
- FERNANDEZ SANCHEZ, B.: Origen, ontogenia y regeneración experimental de las papilas gustativas. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Madrid. 1977.
- GEORGE, P.; JOURNEY, L.J.; GOLDSTEIN, M.N.: Effect of Vincristine on the Fine Structure of HeLa Cells during Mitosis. J. Nat. Cancer Inst. 35, 355-375, 1965.
- JHONSON, I.S.; WRIGHT, H.F.; SVODOBA, G.H.; VLANTIS, J.: Antitumor principles Derived from Vinca rosea Linn. I. Vincalukoblastine and Leucosine. J. Cancer Res. 20, 1016-1022, 1960.
- KOENIG, C.; VIAL, J.D.: A histochemical study of adenosine triphosphatase in the toad (Bufo spinulosus) gastric mucosa. J. of Histochem. Cytochem. 18, 5, 340-345, 1969.

Reunido el Tribunal que suscribe en el día
de la fecha, acordó calificar la presente Tesis
Doctoral con la censura de ~~Aboluto en Grade~~

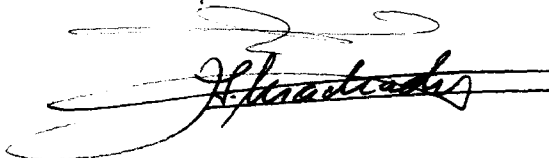
Madrid, 29 Septiembre 1977



Muñoz



Lope Sáez



M. Rodiño



